

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS PASSO FUNDO
CURSO DE MEDICINA

ARTHUR FELIX MARCOLIN

DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE

PASSO FUNDO - RS

2024

ARTHUR FELIX MARCOLIN

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE**

Trabalho de Curso apresentado como requisito parcial
para a obtenção do título de Médico pela Universidade
Federal da Fronteira Sul - Campus Passo Fundo/RS.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Jossimara Poletti

Coorientadora: Prof.^a Me.^a Daniela Augustin Silveira

PASSO FUNDO - RS

2024

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Marcolin, Arthur Felix

Detecção e genotipagem de papilomavírus humano (HPV) em carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe / Arthur Felix Marcolin. -- 2024.
57 f.

Orientadora: Doutora Jossimara Polettini

Co-orientadora: Mestra Daniela Augustin Silveira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Medicina, Passo Fundo, RS, 2024.

1. Papilomavírus Humano. 2. Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço. 3. Imuno-Histoquímica. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. I. Polettini, Jossimara, orient. II. Silveira, Daniela Augustin, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

ARTHUR FELIX MARCOLIN

**DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE**

Trabalho de Curso apresentado como requisito parcial
para a obtenção do título de médico pela Universidade
Federal da Fronteira Sul - Campus Passo Fundo/RS

Este Trabalho de Curso foi defendido e aprovado pela banca em: **13/11/2024**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr.^a Jossimara Poletini - UFFS PF

Orientadora

Prof^a Dr.^a Graziella Alebrant Mendes - UFFS PF

Avaliadora

Prof. Dr. Amauri Braga Simonetti - UFFS PF

Avaliador

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela recuperação após o acidente, que me permitiram seguir em frente e finalizar este trabalho.

À minha orientadora, Jossimara Poletini, pelo carinho, paciência e dedicação em me auxiliar neste processo.

À minha coorientadora, Daniela Augustin Silveira, por toda a gentileza e pelas contribuições ao desenvolvimento deste projeto.

Aos meus pais, Adriani Felix e Milton Marcolin, pelo apoio e amor incondicional, além do ensinamento de que a educação é o bem mais importante a ser conquistado.

Ao meu irmão, Augusto Marcolin, pelo companheirismo e pelos conselhos.

Aos colegas e amigos, por tornarem a vida mais leve e, conseqüentemente, por facilitarem o desenvolvimento deste trabalho.

APRESENTAÇÃO

Trata-se de um Trabalho de Curso (TC) de graduação, elaborado pelo acadêmico Arthur Felix Marcolin, como requisito parcial para a obtenção de título de Médico pela Universidade da Fronteira Sul (UFFS), campus Passo Fundo-RS, sob a orientação da Prof.^a Dr.^a Jossimara Poletini e coorientação da Prof.^a Me. Daniela Augustin Silveira, cujo título é “ Detecção e genotipagem de Papilomavírus Humano (HPV) em carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe”. Caracteriza-se por um estudo observacional, quantitativo, do tipo transversal, descritivo e analítico, desenvolvido no Hospital São Vicente de Paulo de Passo Fundo e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS. Está em conformidade com as normas do Manual de Trabalhos Acadêmicos da UFFS e com o Regulamento de TC do Curso, sendo composto pelo projeto de pesquisa, relatório de atividades e artigo científico, desenvolvidos ao longo do quinto, sexto e sétimo semestre do curso de Medicina da UFFS. O primeiro capítulo consiste no projeto de pesquisa, elaborado no componente curricular (CCr) de Trabalho de Curso I, no segundo semestre de 2023. O segundo capítulo consiste no relatório de pesquisa, o qual aborda temas como coleta e análise de dados e compilação no artigo final, tendo sido desenvolvido no CCr de Trabalho de Curso II, durante o primeiro semestre de 2024. O terceiro capítulo, elaborado no CCr de Trabalho de Curso III no segundo semestre de 2024, traz o artigo científico, produzido a partir dos resultados obtidos após realização prática do projeto de pesquisa, por meio da coleta e análise dos dados encontrados.

RESUMO

O câncer de cavidade oral e orofaringe representa um importante problema de saúde pública, com incidência mundial crescente e aumento de casos relacionados ao papilomavírus humano (HPV). Assim, destaca-se a importância de analisar a relação viral na carcinogênese de tumores no noroeste gaúcho. Este estudo buscou verificar a frequência da positividade para o HPV em amostras de Carcinoma de Células Escamosas (CCEs) de cavidade oral e orofaringe, além de analisar os subtipos virais mais frequentes e caracterizar clinicamente e sociodemograficamente a população. Trata-se de um estudo quantitativo, observacional, transversal, descritivo e analítico, realizado de março a dezembro de 2024, com amostra de pacientes que foram submetidos à biópsia de tumores de cavidade oral e orofaringe entre 2010 e 2020, analisadas pelo laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo. As amostras tumorais, incluídas em parafina e armazenadas foram seccionadas em micrótomo e submetidas à extração de DNA total e pesquisa de DNA-HPV pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando-se primers específicos, etapa desenvolvida no laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS. Adicionalmente, as amostras foram submetidas à análise imunohistoquímica para detecção da superexpressão da p16. A análise estatística foi realizada em dois momentos: primeiramente, foi realizada a distribuição de frequências absolutas e relativas das variáveis descritivas e prevalência da positividade para DNA-HPV utilizando o teste do qui quadrado ($p < 0,05$); em um segundo momento, foi avaliada a relação entre a positividade para a proteína p16 e o HPV. A amostra ($n=49$), foi composta majoritariamente por homens (79,6%), brancos (87,8%), com nível escolar fundamental incompleto (49%), idade entre 56 a 65 anos (40,8%), com histórico etílico (55,1%) e de tabagismo (65,3%). Desses, 10 (20,4%) testaram positivo para o DNA-HPV, dos quais apresentaram a orofaringe (50%) como região mais acometida, estadiamento tumoral I (40%), 40% evoluíram para óbito e, desses, metade foi em tempo superior a 1 ano. Foram detectados os subtipos virais em 90% da amostra, verificando a presença dos subtipos 16, 33, 45, 52 e 58, com o tipo 52 sendo o mais frequente (40%). Além disso, não houve relação da imunohistoquímica com os achados da PCR. Portanto, sugere-se que o CCE de cavidade oral e orofaringe acomete mais frequentemente homens, brancos, na sexta década de vida, tabagistas, etilistas e de menor escolaridade, com cerca de $\frac{1}{5}$ apresentando positividade para HPV, cujos genótipos de alto risco são além dos bem estabelecidos 16 e 18. Com isso, espera-se que o presente estudo possa contribuir para a formulação de políticas públicas de combate desses agentes etiológicos.

Palavras chave: Papillomavirus Humano; Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço; Imuno-Histoquímica; Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

Oral cavity and oropharyngeal cancer represent a significant public health concern, with rising global incidence and an increasing number of cases associated with human papillomavirus (HPV). Thus, the importance of analyzing the viral role in the carcinogenesis of tumors in the northwest region of Rio Grande do Sul is highlighted. This study aimed to determine the frequency of HPV positivity in samples of Squamous Cell Carcinoma (SCC) of the oral cavity and oropharynx, to analyze the most frequent viral subtypes, and to clinically and sociodemographically characterize the affected population. This is a quantitative, observational, cross-sectional, descriptive, and analytical study conducted from March to December 2024. The sample comprised patients who underwent biopsies of oral cavity and oropharyngeal tumors between 2010 and 2020, analyzed at the Pathology Laboratory of São Vicente de Paulo Hospital. The tumor samples, embedded in paraffin and stored, were sectioned using a microtome and subjected to total DNA extraction and HPV DNA detection through Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific primers, a stage performed at the Biochemistry and Molecular Biology Laboratory of UFFS. Additionally, the samples underwent immunohistochemical analysis to detect p16 overexpression. Statistical analysis was conducted in two phases: first, absolute and relative frequency distributions of descriptive variables and HPV DNA positivity prevalence were evaluated using the chi-square test ($p < 0.05$); second, the relationship between p16 protein positivity and HPV was assessed. The sample ($n=49$) consisted predominantly of men (79.6%), white individuals (87.8%), with incomplete elementary education (49%), aged between 56 and 65 years (40.8%), and with a history of alcohol consumption (55.1%) and smoking (65.3%). Of these, 10 individuals (20.4%) tested positive for HPV DNA, with the oropharynx being the most affected region (50%). Among these cases, 40% were diagnosed at tumor stage I, 40% progressed to death, and, of those, half occurred more than one year after diagnosis. Viral subtypes were identified in 90% of the positive samples, with subtypes 16, 33, 45, 52, and 58 detected, and subtype 52 being the most frequent (40%). Furthermore, no correlation was found between immunohistochemistry results and PCR findings. In conclusion, the study suggests that SCC of the oral cavity and oropharynx more commonly affects men, white individuals, in their sixth decade of life, smokers, alcohol consumers, and those with lower educational levels, with approximately one-fifth testing positive for HPV, including high-risk genotypes beyond the well-established types 16 and 18. This study is expected to contribute to the formulation of public health policies aimed at combating these etiological agents.

Keywords: Human Papillomavirus; Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; Immunohistochemistry; Polymerase Chain Reaction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1. PROJETO DE PESQUISA.....	11
2.1.1. Tema.....	11
2.1.2. Problemas.....	11
2.1.3. Hipóteses.....	12
2.1.4. Objetivos.....	12
2.1.4.1. Objetivo geral.....	12
2.1.4.2. Objetivos específicos.....	12
2.1.5. Justificativa.....	13
2.1.6. Referencial teórico.....	14
2.1.6.1. Definição e epidemiologia.....	14
2.1.6.2. Carcinoma de Células Escamosas (CCE) e HPV.....	15
2.1.6.3. Fisiopatologia.....	16
2.1.6.4. Rastreamento de CCEs DNA-HPV (+).....	17
2.1.7. Metodologia.....	18
2.1.7.1. Tipo de estudo.....	18
2.1.7.2. Local e período de realização.....	18
2.1.7.3. População e amostragem.....	18
2.1.7.4. Variáveis, instrumentos e coleta de dados.....	19
2.1.7.5. Processamento, controle de qualidade e análise de dados.....	20
2.1.7.6. Protocolos laboratoriais.....	20
2.1.7.7. Aspectos éticos.....	22
2.1.8. Recursos.....	22
2.1.9. Cronograma.....	23
2.1.10. Referências.....	23
2.1.11. Apêndices e anexos.....	26
ANEXO A.....	26
ANEXO B.....	27
ANEXO C.....	29
ANEXO D.....	33
3. RELATÓRIO DE PESQUISA.....	38
3.1. APRESENTAÇÃO.....	38
3.2. DESENVOLVIMENTO.....	38
3.2.1. Informações gerais e coleta de dados.....	38
3.2.2. Mudanças no projeto.....	39
3.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
4. ARTIGO.....	42
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	57

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um grande desafio para os sistemas públicos de saúde, visto que, mundialmente, figura dentre as principais causas de morte. Além disso, configura-se como uma importante barreira para o aumento da expectativa de vida da população, já que, em 134 países de 183 estudados, a doença está entre a primeira e a segunda causa de morte prematura, entre os 30 e 69 anos de idade (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). De acordo com estatísticas globais, a incidência e mortalidade aumentam em ritmo acelerado em todo o mundo (SUNG *et al*, 2021). Há diversos fatores que justificam tal cenário, como a transição demográfica, mudanças comportamentais e exposições ambientais (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020). No Brasil, estima-se que, durante o triênio de 2023 a 2025, ocorrerão 483 mil novos casos de câncer, desconsiderando os tumores de pele não melanoma (INCA, 2023).

Nesse contexto, o câncer de cavidade oral e orofaringe ocupa um lugar de destaque na incidência global, apresentando a estimativa de mais de 470 mil novos casos no mundo de acordo com a última estatística (SUNG *et al*, 2021). Nacionalmente, esse tipo de neoplasia também apresenta grande relevância, pois espera-se 15.100 novos casos durante cada ano do triênio de 2023 a 2025, sendo 11.900 em homens e 4.200 em mulheres (INCA, 2023). Desses casos, é provável que a maioria sejam do tipo carcinoma de células escamosas (CCEs), porque é o tipo histológico mais comum encontrado nos tumores dos sítios em questão (ROBBINS *et al*, 2013).

O desenvolvimento desse tipo de neoplasia depende de fatores intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo, tendo como principais fatores de risco a exposição crônica às variadas formas de tabagismo e ao consumo de álcool (WYSS *et al*, 2013; HASHIBE *et al*, 2009). No entanto, nas últimas décadas, verificou-se, também, uma importante interação do Papilomavírus Humano (HPV) com os CCEs de cabeça e pescoço, sobretudo na orofaringe (CHATURVEDI *et al*, 2008). Essa relação carcinogênica ocorre principalmente nas infecções por HPV de alto risco, com destaque para o tipo 16 (VANI *et al*, 2022).

Existem diferentes métodos para avaliar a presença de HPV em CCEs de cabeça e pescoço, cada um apresentando suas respectivas vantagens e desvantagens. Dentre tais métodos, a verificação, por meio da imunohistoquímica, da superexpressão da proteína p16 apresenta-se como uma ferramenta promissora, pois é uma técnica relativamente barata e confiável para análise fisiopatológica da atividade do HPV em CCEs, sobretudo na orofaringe. Ademais, a técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR) é muito útil para detecção do DNA-HPV nas amostras, além de ser capaz de genotipar o vírus detectado, sendo recomendada utilizá-la concomitantemente à

imunohistoquímica. É importante ressaltar que existem outras técnicas com excelente sensibilidade e especificidade para detecção da atividade carcinogênica do HPV em CCE's, contudo, o custo elevado de tais métodos é um entrave para aplicá-las rotineiramente (AUGUSTIN *et al*, 2020).

Diante do contexto exposto, nota-se que a infecção por HPV apresenta grande relevância no contexto oncológico de cavidade oral e orofaringe, evidenciando um notório problema de saúde pública. Dessa maneira, o presente estudo tem como objetivo geral analisar a positividade para o HPV em amostras de CCEs, bem como determinar o subtipo viral mais frequente nas amostras positivas.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. PROJETO DE PESQUISA

2.1.1. Tema

Detecção e genotipagem de Papilomavírus Humano (HPV) em carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe.

2.1.2. Problemas

Qual a positividade de DNA-HPV nas amostras carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe?

Quais subtipos de HPV são mais frequentes em amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe?

Qual a positividade e distribuição anatômica dos genótipos de HPV em carcinoma de células escamosas e de cavidade oral e orofaringe?

Qual a relação da expressão da proteína p16 identificada por reação imuno-histoquímica e a presença de DNA-HPV?

Qual a relação do tempo de evolução entre o diagnóstico da neoplasia e óbito do paciente com a positividade de DNA-HPV?

Qual o sexo, faixa etária, etnia, extensão do tumor (conforme os critérios do TNM) e os hábitos de vida (tabagismo e etilismo) dos pacientes que apresentam positividade para o DNA-HPV?

2.1.3. Hipóteses

A positividade de DNA-HPV estará presente entre 25-40% das amostras de carcinoma de células escamosas.

Os subtipos de HPV de alto risco oncogênico são mais prevalentes, sendo que o subtipo 16 está presente em 50% a 60% dos casos.

A positividade será maior na orofaringe (área tonsilar, base da língua, palato mole e parede posterior da faringe), seguindo a maior frequência de DNA-HPV de alto risco nessas regiões anatômicas.

Existe relação entre a positividade de proteína p16 identificada por reação imuno-histoquímica e a presença de DNA-HPV.

O tempo de evolução entre o diagnóstico da neoplasia e óbito do paciente é maior em amostras positivas para DNA-HPV.

Dos pacientes positivos para o DNA-HPV, a maioria será do sexo masculino, de etnia caucasiana, com média de idade inferior a 60 anos, com tumores menos agressivos e com histórico de hábitos de vida negativo para tabagismo e etilismo.

2.1.4. Objetivos

2.1.4.1. Objetivo geral

Determinar a positividade e genotipagem de Papilomavírus Humano (HPV) em amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe.

2.1.4.2. Objetivos específicos

Determinar a positividade e os subtipos de DNA-HPV nas amostras de interesse do estudo.

Descrever as regiões anatômicas acometidas (língua, orofaringe, assoalho da boca, palato, gengiva ou mucosa oral) e a frequência de positividade de DNA-HPV nessas áreas.

Verificar a relação da presença de DNA-HPV com a positividade da reação imuno-histoquímica para proteína p16.

Avaliar a relação da positividade de DNA-HPV e o tempo de evolução entre o diagnóstico da neoplasia e óbito do paciente.

Caracterizar sociodemograficamente e clinicamente os pacientes submetidos à retirada cirúrgica dos CCEs de cavidade oral e/ou orofaringe.

2.1.5. Justificativa

Os tumores que afetam a cavidade oral e a orofaringe têm uma importância significativa no contexto nacional, ocupando a oitava posição entre os tipos de câncer mais comuns. Muitos desses casos poderiam ser prevenidos, uma vez que fatores comportamentais desempenham um papel decisivo na carcinogênese. Historicamente, o uso de tabaco e álcool tem sido associado a esses tumores. No entanto, nas últimas décadas, observou-se uma relação crescente entre o Papilomavírus Humano (HPV) e o surgimento de neoplasias na cabeça e pescoço, principalmente na orofaringe. Entre os subtipos do HPV mais comuns, o tipo 16 se destaca como o mais prevalente.

A associação do HPV com o carcinoma da cavidade oral e da orofaringe está diretamente relacionada ao comportamento sexual dos indivíduos. Nas últimas décadas, mudanças significativas nos padrões de comportamento sexual na população ocidental foram estabelecidas, como início precoce da vida sexual, aumento do número de parceiros e prática de sexo oral. É sabido que tais mudanças favorecem o aumento de casos de tumores de cavidade oral e orofaringe HPV (+), pois facilitam a transmissão e contaminação pelo vírus, que é transmitido principalmente por via sexual.

Além disso, a literatura científica indica uma forte correlação entre o HPV, a proteína p16 e o processo de carcinogênese dos tumores da cavidade oral e da orofaringe. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos dessa relação ainda não estão bem estabelecidos. No presente estudo será possível analisar a expressão da proteína p16 por meio da imunohistoquímica, bem como a detecção e genotipagem para o DNA-HPV, por meio da técnica PCR. Posteriormente, é possível avaliar a presença concomitante do HPV e da proteína p16, além de correlacionar a subtipo mais frequente nessa interação.

Dessa maneira, verificando a interação entre HPV e a proteína p16, bem como a prevalência dos subtipos virais nas amostras de neoplasias de cavidade oral e orofaringe, é possível sugerir sobre a influência do HPV sobre esses tumores na região. Espera-se que a pesquisa contribua para compor estratégias de prevenção e controle das infecções por HPV, por meio da composição de dados regionais. Ademais, acredita-se que esse estudo possa motivar a criação de novas pesquisas na mesma área, seja dentro da UFFS ou em outras instituições, para que os objetivos propostos sejam cumpridos com maior consistência.

2.1.6. Referencial teórico

2.1.6.1. Definição e epidemiologia

Câncer de cabeça e pescoço é um termo que abrange malignidades de origem epitelial de diferentes regiões anatômicas, compreendendo os seguintes locais: cavidade oral, faringe (nasofaringe, orofaringe e hipofaringe), laringe, cavidade nasal, seios paranasais e glândulas salivares (WILD *et al*, 2020). Dentre tais regiões, a cavidade oral e a orofaringe destacam-se pela grande incidência global de câncer de cabeça e pescoço, representando, juntas, cerca de 50% dos novos casos em 2020 (SUNG *et al*, 2021). No Brasil, estima-se que o número de casos de câncer de cavidade oral e orofaringe durante cada ano do triênio de 2023 a 2025 será de aproximadamente 15.100, sendo o oitavo tipo de câncer mais comum no país, excluindo os tumores de pele não melanoma (INCA, 2023). Grande parte das malignidades dessas regiões são carcinomas de células escamosas (CCE), relacionados à mucosa adjacente (WILD *et al*, 2020; ROBBINS *et al*, 2013).

O CCE de cabeça e pescoço pode ser causado por agentes infecciosos e não infecciosos, dependendo, além disso, de fatores genéticos herdados pelos indivíduos (PULLOS; CASTILHO; SQUARIZE, 2015; PARKIN; BRAY, 2006). Possuir diferentes agentes etiológicos relacionados à fisiopatologia evidencia, também, diferenças clínicas e epidemiológicas nos pacientes acometidos pela enfermidade (CHATURVEDI *et al*, 2011; APPLEBAUM *et al*, 2007; SCHWARTZ *et al*, 1998). Tradicionalmente, a doença é fortemente relacionada à exposição às diferentes formas de tabagismo e ao consumo de álcool, e, quando tais fatores de risco estão concomitantemente presentes no indivíduo, parece haver efeito interativo e multiplicativo sob o risco de desenvolver o CCE (WYSS *et al*, 2013; HASHIBE *et al*, 2009). Ademais, nas últimas décadas, verificou-se correlação de tumores de cabeça e pescoço, sobretudo na orofaringe, com o Papilomavírus Humano (HPV), principalmente com os subtipos de alto risco oncogênico (CHATURVEDI *et al*, 2008; PULLOS; CASTILHO; SQUARIZE, 2015).

Estima-se que aproximadamente 70% dos CCEs de cavidade oral e orofaringe sejam causados por exposição crônica ao tabagismo e ao consumo de bebidas alcoólicas, enquanto os 30% remanescentes sejam causados pela interação com o HPV, embora essas proporções variem globalmente (VANI *et al*, 2022). Os pacientes com CCE DNA-HPV (+) costumam ser mais jovens, não fumantes, com nível socioeconômico superior e com a vida sexual mais extensiva em relação aos com CCE não relacionados ao HPV (VANI *et al*, 2022; DU *et al*, 2019; SETTLE *et al*, 2009). Em contrapartida, o prognóstico costuma ser mais favorável para os CCEs DNA-HPV

(+), pois esses tumores tendem a responder melhor às terapias antineoplásicas (DU *et al*, 2019; CHATURVEDI *et al*, 2011).

2.1.6.2. Carcinoma de Células Escamosas (CCE) e HPV

Os Carcinomas de Células Escamosas (CCEs) são lesões malignas que se originam das células epiteliais, podendo acometer a pele e a mucosa de diversas regiões anatômicas. Podem evoluir (ou não) de lesões pré-malignas, como as leucoplasias (placas esbranquiçadas) e as eritroplasias (placas avermelhadas) (ROBBINS *et al*, 2013). Os CCEs da cavidade oral e orofaringe podem se apresentar de várias maneiras, incluindo leucoplaquia (placa branca), eritroplaquia (placa vermelha), eritroleucoplaquia (placa vermelha e branca), crescimento exofítico (massa papilar ou verruciforme, muitas vezes com endurecimento e ulceração da superfície) e crescimento endofítico (ulceração central com uma margem elevada, endurecida) (NEVILLE *et al*, 2019). Além disso, a análise histopatológica permite avaliar o grau de agressividade desse tumor: quanto mais diferenciadas forem as células, menos agressiva será a lesão (ROBBINS *et al*, 2013).

A descoberta do envolvimento do HPV na carcinogênese dos CCEs causou grande impacto na comunidade científica. Primeiramente, em 1974, o médico Harald zur Hausen reportou o envolvimento do vírus no CCE de colo de útero, rendendo-lhe, anos depois, o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2008 (VANI *et al*, 2022). Já em 1983, Kari Syrjänen expôs evidências moleculares e imunohistoquímicas de que o HPV também estava envolvido na patogênese do CCE de cavidade oral (SYRJÄNEN *et al*, 1983).

Mudanças no comportamento sexual, como início precoce da vida sexual, aumento do número de parceiros (incluindo parceiros de sexo oral) e histórico de verrugas genitais (possivelmente causadas por HPV) proporcionam um risco aumentado de desenvolver CCEs DNA-HPV (+), já que a transmissão do vírus acontece principalmente durante o intercuro sexual (SABATINI; CHIOCCA, 2020). É possível que tais mudanças estejam relacionadas ao aumento do número de CCEs DNA-HPV (+) observado nos últimos anos nos Estados Unidos. Inclusive, estima-se que, nos próximos 20 anos, a maior parte dos CCEs de cabeça e pescoço serão causados por HPV no país em questão (CHATURVEDI *et al*, 2011). Nesse contexto, estratégias de prevenção da infecção pelo vírus mostram-se necessárias. Espera-se que as vacinas sejam boas aliadas nesse combate, no entanto, sua eficácia na prevenção de infecção de HPV em cavidade oral e orofaringe ainda é pouco estudada (VANI *et al*, 2022; PULLOS; CASTILHO; SQUARIZE, 2015).

2.1.6.3. Fisiopatologia

Os Papilomavírus humanos (HPVs) correspondem a um diversificado grupo de pequenos vírus de DNA não envelopado conhecidos pela grande capacidade de infectar pele e regiões mucosas (MIRANDA-GALVIS *et al*, 2023; DOORSLAER *et al*, 2018). Mais de 200 tipos de HPV foram identificados e agrupados em cinco gêneros principais: α -HPV, β -HPV, γ -HPV, μ -HPV e ν -HPV. Os vírus do gênero α -HPV são divididos em baixo e alto risco de acordo com o potencial de gerar lesões malignas (VILLIERS *et al*, 2004). A infecção pelo HPV pode permanecer assintomática ou resultar em variados tipos de lesões, desde as benignas (HPVs de baixo risco), como verrugas genitais, até as malignas (HPVs de alto risco), como tumores cervicais e orofaríngeos (ROBBINS *et al*, 2013). Dentre os subtipos de baixo risco mais prevalentes, destacam-se os HPVs 6 e 11, enquanto os subtipos de alto risco mais comuns são o tipo 16 e o 18, (LETO *et al*, 2011; PULLOS; CASTILHO; SQUARIZE, 2015).

O genoma viral é dividido em três regiões: E (early) e L (late), conhecidas como unidades de tradução; e a NCR (*non-coding region*). Os genes da região E possuem inúmeras funções, como replicação viral (E1 e E2), transcrição do DNA (E2), transformação celular (E5, E6 e E7) e imortalização (E6 e E7). Na região L, L1 e L2 codificam, respectivamente, as proteínas principais e as secundárias relacionadas à arquitetura do capsídeo (LETO *et al*, 2011). Dentre os genes expostos, o E6 e o E7 merecem um destaque especial no estudo do surgimento de CCEs associados ao HPV, já que são os principais responsáveis pelo potencial maligno do vírus (PULLOS; CASTILHO; SQUARIZE, 2015).

O HPV pode infectar as células de diferentes maneiras: integrando-se ao DNA do hospedeiro (relacionada, normalmente, às lesões malignas) ou apresentando-se na forma episomal (associada às lesões benignas). É comum que a infecção demore a se manifestar, pois pode apresentar-se tanto na condição latente quanto na forma ativa. Na primeira condição, o HPV fica na forma episomal dentro do núcleo da célula do hospedeiro, não reproduzindo novas partículas virais. Já na forma ativa, o vírus também permanece na forma episomal, mas acaba liberando produtos de sua replicação na superfície do epitélio celular. Caso a infecção seja prolongada (normalmente nos subtipos de alto risco) e a carga viral seja alta, pode ocorrer integração do material genético do vírus ao DNA do hospedeiro, resultando em um quadro infeccioso com alto potencial carcinogênico (BOGLIOLO *et al*, 2021).

Quando o DNA do HPV integra-se ao DNA do hospedeiro, ocorre o bloqueio da transcrição das regiões E1 e E2 do genoma viral e, nesse momento, as regiões E6 e E7 passam a

super expressar suas proteínas, as quais são responsáveis pela transformação celular e pelo desenvolvimento do fenótipo maligno causado pelo vírus (BOGLIOLO *et al*, 2021; MILLER *et al*, 2012). A oncoproteína E6 atua em mecanismos diretos e indiretos para atingir a imortalização celular, tendo como principal função a inibição da proteína p53, responsável pela manutenção da integridade do genoma celular. Para tanto, a proteína E6 forma um complexo trimérico com a p53 e uma ubiquitina ligase denominada E6AP, acarretando ubiquitinação da p53 e posterior degradação da proteína alvo (MILLER *et al*, 2012; HUIBREGTSE *et al*, 1991). Além disso, a proteína E6 contribui para o aumento da sobrevivência das células malignas ao regular positivamente a subunidade enzimática do complexo telomerase (KLINGELHUTZ *et al*, 1996).

Paralelamente, dentre outras vias de atuação, a oncoproteína E7 possui, principalmente, a função de inibir o funcionamento fisiológico da proteína do retinoblastoma (pRB). Nas células em repouso, a pRB encontra-se hipofosforilada e ligada a fatores de transcrição da família E2F, controlando, desse modo, a transcrição de genes (BOGLIOLO *et al*, 2021). No entanto, a proteína E7 tem a capacidade de ligar-se à pRB e degradá-la, permitindo que os membros da família E2F possam transcrever genes mitóticos de maneira descontrolada, já que na ausência da pRB não há como restringir a ação da família E2F (MILLER *et al*, 2012). Além disso, a inativação da pRB leva a superexpressão de uma proteína chamada p16, a qual é possível avaliar por meio da técnica imunohistoquímica (AUGUSTIN *et al*, 2020). Dessa maneira, a ação conjunta das proteínas E6 e E7 leva a proliferação celular anômala e imortalização das células defeituosas, caracterizando o processo carcinogênico (MOODY; LAIMINS, 2010).

2.1.6.4. Rastreio de CCEs DNA-HPV (+)

É muito importante que carcinomas suspeitos por terem sido causados pelo HPV sejam testados, pois as amostras positivas possuem comportamento biológico diferente e costumam ter prognóstico mais favorável em relação às demais. No entanto, é importante ressaltar que o CCE é frequentemente detectado em um estágio avançado, destacando a necessidade de biomarcadores diagnósticos para auxiliar na detecção precoce (FERRIS; WESTRA, 2023). Nesse contexto, existem inúmeras maneiras de detectar o HPV em amostras de tecido tumoral de cabeça e pescoço. Dentre tais metodologias, destacam-se a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) para amplificação de DNA de HPV, *Reverse Transcriptase* (RT) PCR para mRNA E6 e E7, hibridização *in situ* de mRNA E6 e E7, hibridização *in situ* de DNA HPV, imunohistoquímica para proteína p16, sorologia para anticorpos contra proteína E6 e a detecção de DNA tumoral circulante do HPV por PCR

digital. Cada método possui suas respectivas vantagens e desvantagens, mas a imunohistoquímica para procura da expressão da proteína p16 e a PCR de DNA-HPV destacam-se pelo relativo baixo custo, sendo possível aplicá-las no dia-a-dia (AUGUSTIN *et al*, 2020).

A imunohistoquímica é uma técnica com alta sensibilidade e, como a superexpressão para p16 faz parte da fisiopatologia da infecção pelo HPV, sua detecção é aceita como marcador substituto para a infecção pelo HPV em algumas situações (LEWIS *et al*, 2017). No entanto, tal positividade deve ser analisada com cautela, pois pode estar presente em outras condições, como processos inflamatórios, degenerativos e também presença de mutações do p53 (HOLZINGER *et al*, 2012). Para diminuir a probabilidade da técnica servir como falso marcador, é recomendado que outras técnicas sejam utilizadas em conjunto com a imunohistoquímica (LEWIS *et al*, 2017).

O PCR para DNA-HPV ajuda a revelar, com alta sensibilidade, informações adicionais sobre o genótipo do HPV alvo de estudo. Além disso, é recomendado utilizá-la em conjunto com a imunohistoquímica para a proteína p16, principalmente quando a região anatômica alvo é a orofaringe (AUGUSTIN *et al*, 2020). Quando tais técnicas são aplicadas em conjunto, a alta sensibilidade apresentada pela imunohistoquímica é mantida, enquanto a especificidade dos testes aumenta de maneira significativa (PRIGGE *et al*, 2016).

2.1.7. Metodologia

2.1.7.1. Tipo de estudo

Trata-se de um estudo epidemiológico, quantitativo, observacional, transversal, descritivo e analítico.

2.1.7.2. Local e período de realização

O estudo será realizado no período de março a dezembro de 2024, no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS, na cidade de Passo Fundo-RS.

2.1.7.3. População e amostragem

O presente estudo é um recorte do projeto intitulado como “Câncer de Cavidade Oral e Orofaringe: fatores de risco e expressão da proteína P16”, coordenado pela Prof.^a Me. Daniela Augustin Silveira, cujo início se deu no segundo semestre de 2018.

Neste recorte, serão incluídos pacientes que realizaram procedimento cirúrgico para retirada de tumores de cavidade oral e/ou orofaringe. A amostra do estudo, não probabilística e selecionada por conveniência, será formada por pacientes cirúrgicos atendidos no HSVP, no período de janeiro de 2010 a Junho 2024, cujo exame anatomopatológico foi realizado no Laboratório de Patologia do HSVP, com a confirmação do diagnóstico para carcinoma de células escamosas (CCE). Estima-se que a amostra seja composta por 90 pacientes.

Critérios de inclusão: serão incluídos todos os pacientes que realizaram, no HSVP, a retirada cirúrgica de tumores de cavidade oral e/ou orofaringe com a confirmação do diagnóstico para o tipo histológico CCE.

Critérios de exclusão: serão excluídas as amostras que não estiverem adequadas para análise, como material biológico mal preservado e DNA insuficiente para as análises moleculares.

2.1.7.4. Variáveis, instrumentos e coleta de dados

Os dados necessários para a composição do projeto serão coletados pelo acadêmico autor, por meio do acesso às informações do projeto original (transcrição eletrônica de dados secundários), coleta dos dados provenientes das amostras adicionais obtidas por meio da aprovação da emenda do CEP correspondente ao parecer de número 6.518.857 (que tem como objetivo aumentar o número total de pacientes estudados para aumentar o poder estatístico do estudo) e pela análise laboratorial complementar de todas as amostras estudadas. Serão coletados os dados sociodemográficos de sexo, etnia e idade, dados clínicos de hábito tabagista e etilista, tempo de evolução para óbito e se óbito por câncer. Serão 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 estadiamento.

A relação entre variáveis dependentes e independentes será feita em dois momentos. Primeiramente, a positividade das amostras de CCE para o DNA-HPV será considerada a variável dependente, enquanto a região anatômica do tumor, óbito por câncer, tempo de evolução para óbito, estadiamento do tumor, subtipo viral, sexo, cor, idade, histórico de tabagismo e o histórico de consumo de bebida alcoólica serão consideradas as variáveis independentes. Em uma segunda análise, a expressão imuno-histoquímica da proteína p16 será apontada como variável dependente relacionada a positividade das amostras para o DNA-HPV (variável independente). Todos esses componentes estão explicitados de acordo com a ficha de coleta de dados presente no Anexo A.

2.1.7.5. Processamento, controle de qualidade e análise de dados

Os dados obtidos retrospectivamente e por meio das análises laboratoriais serão duplamente digitados em um banco gerado através do *software* Epidata versão 3.1 (distribuição livre). A análise estatística descritiva será feita por meio da distribuição de frequências no programa PSPP (distribuição livre), verificando a prevalência da variável dependente e as proporções das variáveis independentes. Será analisada a relação da variável dependente com as independentes, utilizando o teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher, com nível de significância estatística de 5% e intervalo de confiança de 95%.

2.1.7.6. Protocolos laboratoriais

Previamente a esse estudo, as amostras de tecido tumoral armazenadas em blocos de parafina foram seccionadas em micrótomo comum e avaliadas, por meio da imuno-histoquímica, quanto à expressão da proteína p16, conforme os protocolos utilizados no Laboratório de Patologia do HSVP. Em um segundo momento, foram obtidos, a partir dos mesmos blocos de parafina, 3 cortes de 6 µm de espessura de cada amostra, os quais foram armazenados em microtubos estéreis. Esses microtubos foram transportados para o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS, para futura detecção e genotipagem das amostras para o DNA-HPV, objetivo do presente estudo. Após aprovação de emenda do CEP (item 2.1.7.7), esse mesmo procedimento será realizado nesse estudo para complementação do n amostral.

Para detecção do DNA-HPV, serão necessárias três etapas laboratoriais: desparafinização das amostras, extração do DNA e pesquisa da presença do DNA-HPV. Os cortes serão submetidos à desparafinização e extração total do DNA por meio dos reagentes comerciais Biospin FFPE Tissue Genomic DNA Extraction Kit, Bioer (Hangzhou, Zhejiang, China), de acordo com as especificações do fabricante. A eficiência da extração do DNA das amostras será verificada pela avaliação em espectrofotômetro. Os subprodutos obtidos através desse processo serão armazenados a -20°C até a utilização para pesquisa da presença do DNA-HPV.

Na pesquisa do HPV, será utilizada a técnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR), empregando os iniciadores MY09 e MY11, os quais flanqueiam uma região conservada do gene L1 do HPV e geram um produto amplificado de 450 pares de base, seguida de Nested-PCR com os iniciadores GP5+/GP6+, que flanqueiam um fragmento interno à região anterior do DNA do vírus de 150 pares de base. Dessa maneira, com a utilização concomitante dessas duas técnicas, espera-se aumentar a sensibilidade da reação.

As reações descritas serão realizadas em volume final de 20 uL, composto por 10 uL de PCR Buffer 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega); 1,0 uL de cada primer na concentração de 10 uM; água estéril q.s.p. e 2 uL de cada amostra pesquisada. As incubações serão efetuadas 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. Por fim, 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, por meio da substituição do ácido nucleico por água estéril, e um controle positivo contendo DNA de HPV extraído de células HeLa.

A eficiência da reação será monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% preparada em tampão 1XTBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corada com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados será comparado com o padrão de 100 pares de base e, posteriormente, serão fotografados sob transiluminação ultravioleta em equipamento L-PIX (Loccus Biotecnologia, SP, BR).

Após a etapa da detecção do DNA-HPV, as amostras positivas serão genotipadas de forma a verificar os subtipos virais de alto risco mais prevalentes, por meio da técnica PCR-multiplex. Serão utilizados primers específicos para os tipos 16, 18, 33, 45, 51, 52 e 58 (GUPTA et al., 2020), de acordo com a descrição da Tabela 1. As reações serão realizadas com volume final de 20 uL, composto por 10 uL de PCR Buffer 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega); 1,0 uL de cada primer na concentração de 10 uM; água estéril q.s.p. e 2uL de amostra de DNA. Os parâmetros utilizados serão 94°C durante 5 minutos e 94°C durante 1 minuto para desnaturação, temperatura de anelamento específica durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 37 ciclos idênticos ao descrito. Por fim, a temperatura de extensão final será de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C.

Tabela 1 - Primers

Tipos de HPV	Primer direto (5'-3')	Primer reverso (5'-3')
HPV 16	ATGCATGGAGATACACCTACAT TGCAT	GTTTCTGAGAACAGATGGGGCA CAC
HPV 18	GCTTTGAGGATCCAACACGG	TGCAGCACGAATGGCACTGG
HPV 33	TGAGGATGAAGGCTTGGACC	TGACACATAAACGAACCTGTG
HPV 45	CCCACGCGAACCACAG	TCTAAGGTCCTCTGCCGAGC

HPV 51	TACGTGTTACAGAATTGAAG	AACCAGGCTTAGTTCGCCCCATT
HPV 52	GCAGAACAAGCCACAAGCAA	TAGAGTACGAAGGTCCGTCG
HPV 58	CGAGGATGAAATAGGCTTGG	ACACAAACGAACCGTGGTGC

Fonte: Adaptado de Gupta et al., 2020.

2.1.7.7. Aspectos éticos

O projeto do qual esse estudo faz parte foi desenvolvido de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), sendo submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFFS através dos pareceres de número 2.673.402 (Anexo B), 4.301.338 (Anexo C) e 6.581.857 (Anexo D).

É importante mencionar que os pacientes envolvidos na pesquisa serão submetidos ao risco de identificação. No entanto, os dados serão manuseados apenas pela equipe responsável pelo projeto, e todos os membros comprometem-se em não divulgá-los. Ademais, serão atribuídos números aos pacientes ao invés do nome próprio, aumentando o sigilo das informações. Caso o risco se concretize, a pesquisa será interrompida imediatamente.

Não haverá benefícios diretos aos pacientes, contudo, levando em consideração a relevância da detecção e genotipagem do HPV no contexto oncológico, a divulgação dos resultados da pesquisa oferece grande benefício à comunidade, pois os profissionais da saúde poderão utilizá-los na prática clínica para subsidiar estratégias de prevenção e tratamento. Não ocorrerá devolutiva direta aos pacientes ou familiares, porém uma cópia do artigo desenvolvido será entregue às instituições envolvidas no projeto.

O sigilo dos dados envolvidos na pesquisa é de responsabilidade dos membros do projeto. Esses dados serão armazenados em arquivos digitais, com acesso restrito à equipe responsável e, após o término da pesquisa, serão mantidos em meios eletrônicos por mais cinco anos. Passado esse período, os arquivos serão deletados permanentemente. O material biológico relacionado às amostras estudadas será descartado após a análise seguindo os protocolos de biossegurança.

2.1.8. Recursos

Tabela 2: orçamento

Itens	Quantidade	Valor unitário (R\$)	Valor total (R\$)
-------	------------	----------------------	-------------------

PCR	900 reações	7,00	6300,00
Kit extração de DNA	100	12	1200,00
Total			7500,00

Fonte: autor (2023).

Os materiais elencados na Tabela 2 serão financiados pela equipe de pesquisa. Além disso, os equipamentos necessários para os procedimentos laboratoriais serão cedidos pela Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo.

2.1.9. Cronograma

Período de realização do projeto: março de 2024 a dezembro de 2024.

Revisão da literatura: março a dezembro de 2024.

Coleta de dados: março a agosto de 2024.

Processamento laboratorial: abril a agosto de 2024.

Análise dos dados: agosto a setembro de 2024.

Desenvolvimento e divulgação do artigo: outubro a dezembro de 2024.

2.1.10. Referências

AUGUSTIN, Jeremy Gbenakon et al. HPV Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: What Is the Issue? **Frontiers in Oncology**, v. 10, p. 1-13, 15 novembro 2020.

APPLEBAUM, Katie M. et al. Lack of Association of Alcohol and Tobacco with HPV16-Associated Head and Neck Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 99, n. 23, p. 1801–1810, 05 dezembro 2007.

CHATURVEDI, Anil K. et al. Human Papillomavirus and Rising Oropharyngeal Cancer Incidence in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 32, p. 4294–4301, 10 novembro 2010.

CHATURVEDI, Anil K. et al. Incidence Trends for Human Papillomavirus–Related and –Unrelated Oral Squamous Cell Carcinomas in the United States. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 04, p. 612-619, 01 fevereiro 2008.

DOORSLAER, Koenraad Van et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Papillomaviridae. **Journal of General Virology**, v. 99, n. 08, p. 989–990, 21 junho 2018.

DU, Eugenie et al. Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site,

Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. **The Laryngoscope**, v. 129, n. 11, p. 2506–2513, 19 janeiro 2019.

FERRIS, Robert L.; WESTRA, William. Oropharyngeal carcinoma with a special focus on HPV-related squamous cell carcinoma. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 18, n. 1, p. 515–535, 24 janeiro 2023.

FILHO, Geraldo Brasileiro. Bogliolo - Patologia. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.

GUPTA, Ishita et al. Co-prevalence of human Papillomaviruses (HPV) and Epstein–Barr virus (EBV) in healthy blood donors from diverse nationalities in Qatar. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, 3 abr. 2020.

HASHIBE, Mia et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. **Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention**, v. 18, n. 02, p. 541–550, 01 fevereiro 2009.

HOLZINGER, D. et al. Viral RNA Patterns and High Viral Load Reliably Define Oropharynx Carcinomas with Active HPV16 Involvement. **Cancer Research**, v. 72, n. 19, p. 4993–5003, 1 out. 2012.

HUIBREGTSE, J.M., et al. “A Cellular Protein Mediates Association of P53 with the E6 Oncoprotein of Human Papillomavirus Types 16 or 18.” **The EMBO Journal**, v. 10, n. 13, p. 4129–413, 01 dezembro 1991.

KLINGELHUTZ, A. J.; FOSTER, S. A.; MCDUGALL, J. K. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. **Nature**, v. 380, n. 6569, p. 79–82, 07 março 1996.

LETO, Maria das Graças Pereira et al. Infecção pelo papilomavírus humano: etiopatogenia, biologia molecular e manifestações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. 02, p. 306–17, 01 abril 2011.

LEWIS, J. S. et al. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 142, n. 5, p. 559–597, 18 dez. 2017.

MILLER, DANIEL L.; PURICELLI, MICHAEL D.; STACK, M. SHARON. Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus) associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Biochemical Journal**, v. 443, n. 2, p. 339–353, 15 abr. 2012.

MIRANDA-GALVIS, Marisol et al. New Insights into the Impact of Human Papillomavirus on Oral Cancer in Young Patients: Proteomic Approach Reveals a Novel Role for S100A8. **Cells**, v. 12, n. 09, p. 1323–1342, 05 maio 2023.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550–560, 01 julho. 2010.

NEVILLE, Brad W. et al. Atlas de Patologia Oral e Maxilofacial. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2019.

PARKIN, D. Maxwell; BRAY, Freddie. Chapter 2: The burden of HPV-related cancer. **Vaccine**, v. 24, n. 03, p. 11-25, 31 agosto 2006.

PRIGGE, E.-S. et al. Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 5, p. 1186–1198, 02 dezembro 2016

PULLOS, A.N; CASTILHO R.M.; SQUARIZE C.H. HPV Infection of the Head and Neck Region and Its Stem Cells. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 11, p. 1532–1543, 9 setembro 2015.

SABATINI, Maria Elisa; CHIOCCA, Susanna. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 03, p. 306–314, 04 fevereiro 2020.

SCHWARTZ, Stephen M. et al. Oral Cancer Risk in Relation to Sexual History and Evidence of Human Papillomavirus Infection. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 21, p. 1626–1636, 04 novembro 1998.

SETTLE, Kathleen et al. Racial Survival Disparity in Head and Neck Cancer Results from Low Prevalence of Human Papillomavirus Infection in Black Oropharyngeal Cancer Patients. **Cancer Prevention Research**, v. 02, n. 09, p. 776-781, 29 julho 2009.

SUNG, Hyuna et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 03, p. 209–249, 4 fevereiro 2021.

SYRJÄNEN, Kari et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. **International Journal of Oral Surgery**, v. 12, n. 6, p. 418-424, dezembro 1983.

ROBBINS, Stanley L. et al. Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

VANI, N. V. et al. Dynamics of oral human papillomavirus infection in healthy population and head and neck cancer. **Cancer Medicine**, v. 12, n. 10, p. 11731–11745, 27 fevereiro 2023.

VILLIERS, Ethel-Michele de et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 01, p. 17-27, 20 junho 2004.

WILD, Christopher P. *et al.* World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. **International Agency for Research on Cancer**. 2020.

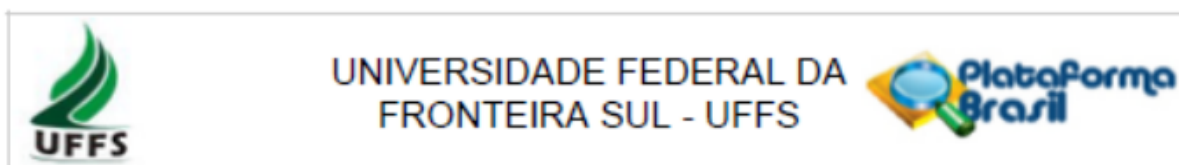
WYSS, Annah et al. Cigarette, Cigar, and Pipe Smoking and the Risk of Head and Neck Cancers: Pooled Analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **American Journal of Epidemiology**, v. 178, n. 05, p. 679-690, 30 junho 2013.

2.1.11. Apêndices e anexos

ANEXO A

FICHA DE COLETA DE DADOS	
Número do formulário: _ _	
Data do diagnóstico: _ _ / _ _ / _ _ _ _	DATD
Sexo:	SEX
Cor:	COR
Idade:	IDA
Histórico de tabagismo: (1) Tabagista (2) Ex-consumidor (3) Nunca	HTAB
Histórico de consumo de bebida alcoólica: (1) Sim (2) Ex-consumidor (3) Nunca	HCBA
Óbito: (1) Sim (2) Não (3) Não informado	OBITO
Data do óbito: _ _ / _ _ / _ _ _ _	DATO
Região anatômica do tumor: (1) Língua (2) Orofaringe (3) Assoalho da boca (4) Palato (5) Cavidade oral (não especificado) (6) Gengiva (7) Mucosa da bochecha	RAT
Estadiamento: (1) (2) (3) (4)	ESTAD
Positividade para p16 (Imuno-histoquímica): (1) Sim (2) Não	P16
Resultado do PCR para HPV: (1) Positivo (2) Negativo	HPV
Tipo de HPV: (1) 16 (2) 18 (3) 33 (4) 45 (5) 51 (6) 52 (7) 58 (8) Outro	THPV

ANEXO B

**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:



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



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_191808.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:

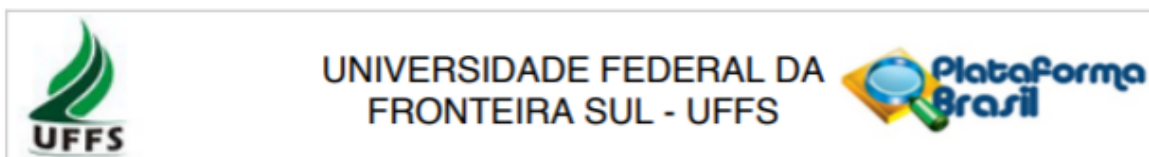
Não

CHAPECO, 24 de Maio de 2018

Assinado por:

Valéria Silvana Faganello Madureira
(Coordenador)

ANEXO C

**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

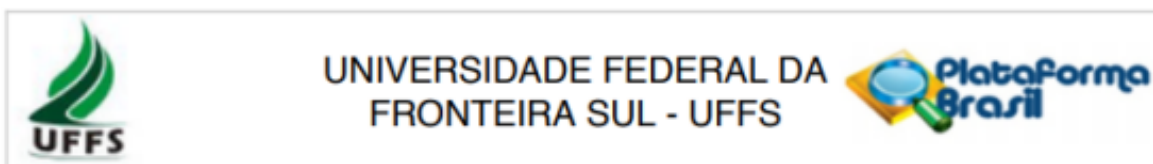
Apresentação do Projeto:

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 Papilomavirus 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 (imunoistoquímica) 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.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



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 publicização 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_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_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



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 4.301.338

Ausência	CRONOGRAMA.pdf	08/04/2018 19:57:41	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Folha de Rosto	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 D

UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS

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:** 5**CAAE:** 84787818.7.0000.5564**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL - UFFS**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.581.857**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de apresentação de emenda ao projeto de pesquisa intitulado Câncer de Cavidade Oral e Orofaringe: Fatores de Risco e expressão da proteína P16 para o qual a pesquisadora responsável encaminhou a justificativa abaixo:

Justificativa da Emenda: As emendas (2 e 3) no atual projeto justificam-se pelo acréscimo de novos pesquisadores no trabalho: Dr. André Roberto Mozzini por ser o médico assistente dos pacientes analisados, a Dra. Antonella Belleza médica residente do serviço por fazer o acompanhamento e a busca dos pacientes nos prontuários e o aluno Arthur Marcolin que participará do processamento das amostras tumorais e realizará a pesquisa de HPV nas novas amostras a serem incluídas no projeto, a residente contribuirá com a pesquisa na seleção das amostras e coleta dos dados clínicos. A emenda solicita, também, ampliação do cronograma para coleta e processamento de um número amostral maior.

Objetivo da Pesquisa:

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 e cavidade oral,

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar**Bairro:** Área Rural**CEP:** 89.815-899**UF:** SC**Município:** CHAPECO**Telefone:** (49)2049-3745**E-mail:** cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 6.581.857

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 presente emenda trata-se de justificam-se pelo acréscimo de novos pesquisadores no trabalho: Dr. André Roberto Mozzini por ser o médico assistente dos pacientes analisados, a Dra. Antonella Belleza médica residente do serviço por fazer o acompanhamento e a busca dos pacientes nos prontuários e o aluno Arthur Marcolin que participará do processamento das amostras tumorais e realizará a pesquisa de HPV nas novas amostras a serem incluídas no projeto, a residente contribuirá com a pesquisa na seleção das amostras e coleta dos dados clínicos. A emenda solicita, também, ampliação do cronograma para coleta e processamento de um número amostral maior.

Em função do pedido justificado da emenda, todos os campos da PB foram alterados

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há necessidade de alteração do TCLE devido a integração de pesquisadores na equipe de pesquisa em função da aprovação para a dispensa do TCLE (justificado na aprovação do projeto)

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



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:



UNIVERSIDADE FEDERAL DA
FRONTEIRA SUL - UFFS



Continuação do Parecer: 6.581.857

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_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_2235651_E2.pdf	16/11/2023 08:41:03		Aceito
Outros	Solicitacao_Emenda_3_p16_HPV_tumores.doc	16/11/2023 08:33:35	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	Projeto_p16_HP_emenda_2_PlatBrasil.pdf	24/10/2023 16:05:18	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Outros	Emenda2.pdf	24/10/2023 16:04:02	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Solicitacao_Emenda_p16_HPV_tumoresassinado.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 Ausência	CRONOGRAMA.pdf	08/04/2018 19:57:41	Daniela Augustin Silveira	Aceito
Folha de Rosto	20180405_191606.pdf	08/04/2018 19:54:37	Daniela Augustin Silveira	Aceito

Endereço: Rodovia SC 484 Km 02, Fronteira Sul - Bloco da Biblioteca - sala 310, 3º andar

Bairro: Área Rural

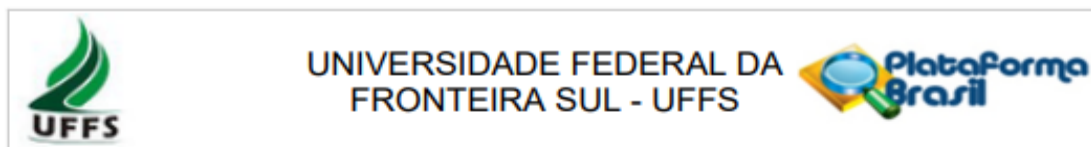
CEP: 89.815-899

UF: SC

Município: CHAPECO

Telefone: (49)2049-3745

E-mail: cep.uffs@uffs.edu.br



Continuação do Parecer: 6.581.857

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, 14 de Dezembro de 2023

Assinado por:
Renata dos Santos Rabello
 (Coordenador(a))

3. RELATÓRIO DE PESQUISA

3.1. APRESENTAÇÃO

O presente relatório tem como objetivo detalhar o desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado como “DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE”, o qual busca determinar a prevalência e genotipagem do DNA-HPV encontrado em amostras de Carcinoma de Células Escamosas (CCE) de cavidade oral e/ou orofaringe retirados de pacientes atendidos no Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) de Passo Fundo. Além disso, o projeto também visa caracterizar sociodemograficamente a população estudada. O estudo foi desenvolvido sob orientação da Prof.^a Dr.^a Jossimara Poletini e coorientação da Prof.^a Me.^a Daniela Augustin Silveira.

3.2. DESENVOLVIMENTO

O projeto, desenvolvido no decorrer do primeiro semestre letivo do ano de 2024, é um recorte do projeto intitulado como “Câncer de Cavidade Oral e Orofaringe: Fatores de Risco e expressão da proteína P16”, o qual foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da UFFS cujo os pareceres correspondem aos números 2.658.209, 4.301.338 e 6.581.857. Para sua execução, serão acessados os dados das etapas anteriores e processado os dados dos pacientes incluídos na última tramitação ética (emenda de número 6.581.857), bem como a análise laboratorial de todas as amostras.

3.2.1. Informações gerais e coleta de dados

A escrita do projeto de pesquisa do presente trabalho foi desenvolvida no componente curricular (CCR) de Trabalho de Curso (TC) I durante o segundo semestre de 2023, sob a orientação do Prof.^a Dr.^a Jossimara Poletini e coorientação da coorientação da Prof.^a Me.^a Daniela Augustin Silveira, de acordo com as normas do Manual de Trabalhos Acadêmicos da UFFS e do Regulamento de TC do Curso.

Referente à coleta de dados, como o presente estudo é um recorte de um projeto maior, a coleta se iniciou em 2018 por estudantes integrantes da equipe. Em março de 2024, o acadêmico ingressou na parte prática do projeto e começou a participar ativamente das coletas. Nesse mesmo

mês, por meio de uma reunião, a Prof^a. Jossimara explicou para o acadêmico como prosseguir com as análises laboratoriais.

Como já havia 42 amostras armazenadas desde 2021 (correspondentes às etapas anteriores do projeto), deveriam ser testadas para verificar se ainda restava material genético. Nesse sentido, o acadêmico foi orientado a utilizar o espectrofotômetro e realizar uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) com o gene humano Beta globina em todas as amostras, para verificar a integridade do DNA presente. Os resultados desse teste demonstraram que em 14 amostras não havia mais material para ser analisado. Portanto, os blocos de parafina correspondentes foram novamente acessados e cortes do tecido foram realizados novamente, para que o DNA pudesse ser extraído. Nesse período, 7 amostras adicionais foram incluídas no estudo.

O acadêmico foi orientado a desparafinizar e extrair DNA das 21 amostras, utilizando o kit comercial Biospin FFPE Tissue Genomic DNA Extraction Kit, Bioer (Hangzhou, Zhejiang, China), conforme as recomendações do fabricante. Paralelamente, dados sociodemográficos dos pacientes foram coletados no arquivo do HSVP, com informações extraídas de prontuários eletrônicos. Após essa etapa, procedeu-se à detecção e, se aplicável, a respectiva genotipagem do DNA-HPV em todas as 49 amostras, seguindo a metodologia descrita no projeto. Todos os resultados foram duplamente digitados utilizando o software Epidata versão 3.1 (distribuição gratuita) para que, posteriormente, fossem exportados para o programa PSPP (distribuição livre) para a análise estatística, buscando estabelecer a relação entre variáveis dependentes e independentes.

3.2.2. Mudanças no projeto

Durante a coleta de dados, percebeu-se que a ficha deveria ser alterada para contemplar adequadamente todas as informações relacionadas ao projeto. As modificações realizadas basearam-se nos dados expostos na Tabela 3. Em virtude do reduzido tamanho amostral, não foi possível estabelecer associações com significância estatística. Portanto, as frequências observadas foram apenas descritas. Ademais, verificou-se que a caracterização sociodemográfica deveria abranger toda a população estudada, e não apenas os casos positivos para DNA-HPV. Dessa maneira, todos os casos selecionados foram analisados considerando variáveis como sexo, faixa etária, cor da pele, escolaridade e hábitos de vida (tabagismo e etilismo).

Tabela 3 - ficha de coleta de dados reformulada

FICHA DE COLETA DE DADOS	
Número do formulário: __	
Data do diagnóstico: __/__/____	DATD
Sexo: (1) masculino (2) feminino (3) não informado	SEX
Cor da pele: (1) branco (2) preto (3) amarelo (4) pardo (5) indígena (6) não informado	COR
Escolaridade: (1) nenhuma (2) fundamental incompleto (3) fundamental completo (4) ensino médio (5) nível superior incompleto (6) nível superior completo (7) não informado	ESC
Idade:	IDA
Histórico de tabagismo: (1) Tabagista (2) Ex-consumidor (3) Nunca (4) não informado	HTAB
Histórico de consumo de bebida alcoólica: (1) Sim (2) Ex-consumidor (3) Nunca (4) não informado	HCBA
Óbito por câncer: (1) Sim (2) Não (3) Não informado	OBITO
Data do óbito: __/__/____	DATO
Região anatômica do tumor: (1) Língua (2) Orofaringe (3) Assoalho da boca (4) Palato (5) Cavidade oral (não especificado) (6) Gengiva (7) Mucosa da bochecha (8) não especificado	RAT
Estadiamento: 0 (1) I (2) II (3) III (4) IV (A, B e C) (5) não informado	ESTAD
Positividade para p16 (Imuno-histoquímica): (1) Sim (2) Não (3) não informado	P16
Resultado do PCR para HPV: (1) Positivo (2) Negativo (3) não informado	HPV
Tipo de HPV: (1) 16 (2) 18 (3) 31 (4) 33 (5) 45 (6) 51 (7) 52 (8) 58 (9) Outro	THPV

3.3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir de agosto de 2024 os resultados da análise dos dados serão compilados e analisados na forma de artigo científico, intitulado “Detecção de genotipagem de papilomavírus humano (HPV) em carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe”, a fim de expor os resultados do estudo de forma mais abrangente, seguindo as normas do Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, objetivando publicação futura do trabalho. Em novembro de 2024, o material produzido nos três volumes deste estudo será sintetizado para sua apresentação final e divulgação para a comunidade acadêmica.

As normas que orientam a escrita do artigo científico estão de acordo com as informações contidas no link abaixo:

<https://www.scielo.br/journal/jbpml/about/#instructions>

4. ARTIGO

DETECÇÃO E GENOTIPAGEM DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE

Arthur Felix Marcolin¹

Daniela Augustin Silveira²

Jossimara Poletini²

¹ Discente no curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo, RS, Brasil.

² Docente no curso de Medicina, Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Passo Fundo, RS, Brasil.

Autor correspondente:

Arthur Felix Marcolin

Curso de Medicina - Universidade Federal da Fronteira Sul, Passo Fundo, RS.

Rua Capitão Araújo, 20. Centro. CEP: 99010-121.

E-mail: arthur.marcolin@uffs.edu.br

RESUMO

Introdução: O câncer de cavidade oral e orofaringe representa um importante problema de saúde pública, com incidência mundial crescente e aumento de casos relacionados ao Papilomavírus Humano (HPV). **Objetivo:** Detectar e genotipar o HPV em amostras de carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe de pacientes submetidos à excisão cirúrgica do tumor no Noroeste Gaúcho, além de caracterizá-los sociodemograficamente. **Material e Métodos:** Estudo transversal com dados secundários e laboratoriais de pacientes atendidos em Passo Fundo, RS. Dados sociodemográficos, comportamentais e clínicos foram coletados por meio de prontuários eletrônicos hospitalares. A detecção do HPV, assim como dos subtipos oncogênicos de HPV, foi realizada por PCR convencional e pela superexpressão da proteína p16 por imunohistoquímica. A análise estatística foi realizada em dois momentos: primeiramente, foi realizada a distribuição de frequências absolutas e relativas das variáveis descritivas e prevalência da positividade para DNA-HPV utilizando o teste do qui quadrado ($p < 0,05$). Em seguida, foi investigada a relação entre a presença de superexpressão da proteína p16 e a positividade para DNA-HPV. **Resultados:** A amostra ($n=49$), foi composta majoritariamente por homens (79,6%), cor de pele branca (87,8%), com nível escolar fundamental incompleto (49%), idade entre 56 e 65 anos (40,8%), com histórico etílico (55,1%) e de tabagismo (65,3%). De todos os participantes, 10 (20,4%) testaram positivo para o DNA-HPV, dos quais 50% apresentaram a orofaringe como região acometida, 40% com estadiamento tumoral I, 40% evoluíram para óbito e, desses, metade foi em tempo superior a 1 ano. Foram detectados os subtipos virais em 90% da amostra, verificando-se a presença dos subtipos 16, 33, 45, 52 e 58, com o tipo 52 sendo o mais frequente (40%), além da positividade para a proteína p16 em 8 casos. **Conclusão:** O CCE apresentou maior prevalência em homens brancos, com idade entre 56 e 65 anos, com histórico de tabagismo, etilismo e menor escolaridade. Aproximadamente 20% dos casos apresentaram positividade para o HPV, sendo os genótipos 16, 33, 45, 52 e 58 os mais frequentes. Esses achados destacam a importância do HPV como fator de risco para o desenvolvimento de CCE e a necessidade de implementar políticas públicas que visem à prevenção e ao controle do câncer bucal, incluindo programas de vacinação, campanhas de conscientização sobre os fatores de risco e o acesso equitativo aos serviços de saúde bucal.

Palavras-chave: Papilomavírus Humano; Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço; Imuno-Histoquímica; Reação em Cadeia da Polimerase.

ABSTRACT

Introduction: Oral cavity and oropharyngeal cancer represent a significant public health issue, with increasing global incidence and a rising number of cases associated with Human Papillomavirus (HPV). **Objective:** To detect and genotype HPV in samples of squamous cell carcinoma from the oral cavity and oropharynx of patients who underwent tumor surgical excision in Northwest Rio Grande do Sul, Brazil, and to characterize these patients sociodemographically. **Materials and Methods:** This is a cross-sectional study utilizing secondary and laboratory data from patients treated in Passo Fundo, RS. Sociodemographic, behavioral, and clinical data were collected from the hospital's electronic medical records. HPV detection, as well as the identification of oncogenic HPV subtypes, was performed through conventional PCR and p16 protein overexpression assessed by immunohistochemistry. Statistical analysis was conducted in two stages: first, absolute and relative frequency distributions of descriptive variables and HPV DNA positivity prevalence were calculated using the chi-square test ($p < 0.05$). Subsequently, the relationship between p16 protein overexpression and HPV DNA positivity was investigated. **Results:** The sample ($n=49$) was predominantly composed of men (79.6%), White individuals (87.8%), with incomplete elementary education (49%), aged between 56 and 65 years (40.8%), and with a history of alcohol use (55.1%) and smoking (65.3%). Of all participants, 10 (20.4%) tested positive for HPV DNA, of whom 50% had the oropharynx as the affected region, 40% presented with stage I tumors, 40% progressed to death, and half of these deaths occurred more than one year after diagnosis. Viral subtypes were identified in 90% of the positive cases, with subtypes 16, 33, 45, 52, and 58 detected; subtype 52 was the most frequent (40%). Additionally, p16 protein positivity was observed in 8 cases. **Conclusion:** Squamous cell carcinoma was more prevalent among White men aged 56 to 65 years, with a history of smoking, alcohol use, and lower educational attainment. Approximately 20% of cases were positive for HPV, with genotypes 16, 33, 45, 52, and 58 being the most frequent. These findings highlight the importance of HPV as a risk factor for the development of squamous cell carcinoma and emphasize the need for public policies aimed at the prevention and control of oral cancer. Such policies should include vaccination programs, awareness campaigns about risk factors, and equitable access to oral health services.

Keywords: Human Papillomavirus; Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; Immunohistochemistry; Polymerase Chain Reaction.

INTRODUÇÃO

O câncer representa um dos maiores desafios de saúde pública global, sendo responsável por um quarto das mortes por doenças não transmissíveis⁽¹⁾. Entre os diversos tipos de câncer, os tumores de cavidade oral e orofaringe destacam-se por seu impacto significativo. Em 2022, foram registrados mais de 495 mil novos casos dessa doença em todo o mundo⁽²⁾. No Brasil, a estimativa é de 15.100 novos casos anuais entre 2023 e 2025, ocupando a oitava posição entre os tipos de câncer mais frequentes no país, excluindo-se os tumores de pele não melanoma⁽³⁾. O Carcinoma de Células Escamosas (CCE) representa a grande maioria desses casos, sendo frequentemente precedido por lesões pré-malignas⁽¹⁾.

O tabagismo e o etilismo, especialmente quando atuam em conjunto, são os principais fatores de risco para o desenvolvimento do processo neoplásico em questão. No entanto, nas últimas décadas, observou-se que a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncológico, com destaque para os subtipos 16 e 18, vem desempenhando um papel etiológico importante, principalmente quando o sítio afetado é a orofaringe^(1,4). Estima-se que 4,9% da população mundial apresente o vírus na mucosa oral, aumentando o risco de desenvolver a doença⁽⁵⁾.

O aumento do número desses tumores está relacionado a mudanças no comportamento sexual da população mundial, como o início precoce da vida sexual e o maior número de parceiros, já que a transmissão do vírus ocorre através do intercuro sexual⁽⁶⁾. Pacientes com tumores associados ao HPV tendem a apresentar um perfil sociodemográfico e prognóstico distintos em relação àqueles que não são positivos para o vírus. Geralmente, os pacientes com tumores positivos para HPV são mais jovens e possuem um nível socioeconômico mais elevado em comparação aos que testam negativo. Além disso, os tumores relacionados ao HPV costumam responder melhor às terapias antineoplásicas. No entanto, os mecanismos fisiopatológicos envolvidos não estão completamente elucidados^(1,4).

A detecção do HPV pode ser realizada por diferentes métodos, cada um com suas respectivas particularidades. A imunohistoquímica, que avalia a superexpressão da proteína p16, é uma técnica indireta para detectar a atividade oncogênica induzida pelo HPV, apresentando boa sensibilidade e um custo relativamente baixo. Por outro lado, a reação em cadeia da polimerase (PCR) permite a detecção direta do DNA viral e sua respectiva genotipagem, oferecendo alta especificidade e sensibilidade, mesmo em tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina⁽⁷⁾.

Dessa maneira, o presente estudo tem como objetivo detectar e genotipar o DNA-HPV em amostras de carcinoma de células escamosas (CCE) da cavidade oral e orofaringe de pacientes

atendidos no noroeste gaúcho, identificando os genótipos mais prevalentes e correlacionando os resultados com as características sociodemográficas e clínicas das lesões de pacientes residentes no noroeste gaúcho.

MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de um estudo transversal realizado no Laboratório de Patologia do Hospital São Vicente de Paulo (HSVP), em Passo Fundo, RS, e no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), campus Passo Fundo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFFS, conforme os pareceres de número 2.673.402, 4.301.338 e 6.581.857.

A amostra, não probabilística e selecionada por conveniência, foi composta por pacientes que realizaram a retirada cirúrgica de carcinoma de células escamosas (CCE) de cavidade oral e orofaringe no HSVP, com confirmação diagnóstica pelo Laboratório de Patologia da mesma instituição, no período de 2010 a 2020. Após a remoção, as peças cirúrgicas foram fixadas em formalina e embebidas em parafina, seccionadas em micrótomo comum e coradas com hematoxilina e eosina para posterior análise anatomopatológica e estadiamento na mesma instituição.

Para análise clínica e sociodemográfica, os dados foram coletados diretamente dos prontuários dos pacientes, levando-se em consideração a data do diagnóstico, sexo, escolaridade, cor da pele, idade, histórico de tabagismo, histórico de etilismo, ocorrência de óbito (se aplicável, incluindo a respectiva data) e região anatômica acometida pelo tumor. Além disso, com base nos resultados do exame anatomopatológico e da imunohistoquímica, realizados no Laboratório de Patologia do HSVP, foram analisados o estadiamento e a superexpressão da proteína p16. Por fim, investigou-se a presença de DNA-HPV e realizou-se a genotipagem correspondente.

Imunohistoquímica

Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo comum para avaliação da superexpressão da proteína p16. Inicialmente, realizou-se a desparafinização e a recuperação antigênica no instrumento FLEX Dako de alto pH, seguida pela incubação com o anticorpo primário p16INK4A (clone IHCO16 - Dako) por 20 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a amplificação foi conduzida utilizando o sistema EnVision FLEX (Dako) com anticorpo secundário, e a revelação foi feita com o sistema cromogênico DAB + Líquido Flex (Dako), seguida de

contracoloração com hematoxilina. Como controle positivo da reação, utilizou-se uma amostra previamente conhecida como positiva para câncer de colo do útero.

A leitura das lâminas foi realizada por dois profissionais, utilizando a estratégia epidemiológica de mascaramento a fim de evitar viés de aferição. A positividade para p16 nos tecidos tumorais foi determinada pela visualização de coloração marrom nas células (nuclear e citoplasmática), com contagem de 500 células em 5 campos, observadas em aumento de 400x no microscópio óptico. Para a análise qualitativa, a superexpressão de p16 foi considerada quando pelo menos 70% das células tumorais apresentaram coloração nuclear e citoplasmática intensa, conforme critério estabelecido pela literatura.

Pesquisa de DNA-HPV e genotipagem

Após a investigação anatomopatológica e imunohistoquímica no HSVP, os blocos de parafina foram seccionados em três cortes de 5 µm utilizando um micrótomo comum, os quais foram armazenados em microtubos estéreis. Em seguida, as amostras foram desparafinizadas e submetidas à extração do DNA total, utilizando o kit comercial Biospin FFPE Tissue Genomic DNA Extraction Kit, da Bioer (Hangzhou, Zhejiang, China), seguindo as recomendações do fabricante. A eficiência da extração foi verificada por espectrofotometria (*Multiskan Go Microplate Photometer, Thermo Scientific, EUA*). Posteriormente, as amostras foram armazenadas a -20°C no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFFS.

A detecção de DNA-HPV foi realizada por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os iniciadores MY09 e MY11, que flanqueiam uma região do gene L1 do HPV, resultando em um produto amplificado de 450 pb. Para aumentar a sensibilidade da reação, foi empregada a técnica de Nested-PCR, utilizando os primers GP5+/GP6+, que flanqueiam um fragmento interno à região anterior, gerando um produto de 150 pb⁽⁸⁾. Em todas as reações realizadas foi utilizado um controle negativo, através da substituição do ácido nucleico por água estéril, e um controle positivo contendo DNA de HPV extraído de células HeLa.

As amostras que apresentaram resultados positivos para o DNA-HPV foram submetidas à genotipagem. Para tal procedimento, foram utilizados primers diretos (5'-3') e indiretos (5'-3') para os HPVs de alto risco oncogênico do tipo 16, 18, 31, 33, 45, 51, 52 e 58, conforme a descrição de Gupta et al⁽⁹⁾. As reações foram realizadas com volume final de 20 µL, composto por 10 µL de PCR Buffer 2x GoTaq® Green Master Mix (Promega); 1,0 µL de cada primer na concentração de 10 µM; água estéril q.s.p. e 2 µL de amostra de DNA. Os parâmetros utilizados foram 94°C durante 5 minutos e 94°C durante 1 minuto para desnaturação, temperatura de anelamento específica

durante 30 segundos e 72°C durante 1 minuto para polimerização, seguido de mais 37 ciclos idênticos ao descrito. Finalizando, a temperatura de extensão final foi de 72°C por 7 minutos e resfriamento a 4°C.

A eficiência das amplificações das PCRs de detecção e genotipagem foi monitorada pela eletroforese da reação em gel de agarose 1,5% preparada em tampão 1X TBE (Tris/Ácido Bórico/EDTA) e corada com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 50 pb e posteriormente fotografados sob transiluminação ultravioleta.

Análise estatística

Os dados obtidos foram duplamente digitados em planilhas eletrônicas utilizando o software EpiData 3.1 (distribuição livre). Em seguida, as planilhas foram exportadas para o software PSPP versão 3.03 (distribuição livre), no qual foi realizada a análise estatística por meio do teste Qui-quadrado, com intervalo significância estatística de 5% entre as variáveis dependentes e independentes. Inicialmente, a positividade das amostras de CCE para o DNA-HPV foi considerada a variável dependente, enquanto os dados clínicos e os sociodemográficos foram tratados como variáveis independentes. Posteriormente, a superexpressão da proteína p16 foi analisada como variável dependente, sendo relacionada à positividade das amostras para o DNA-HPV.

RESULTADOS

Foram incluídas 49 amostras de CCE de cavidade oral e orofaringe, das quais 10 (20,4%) testaram positivo para o DNA-HPV.

A caracterização sociodemográfica da população total, conforme apresentado na Tabela 1, revelou um predomínio do sexo masculino (79,6%) e de indivíduos autodeclarados brancos (87,8%), sendo que 67,3% pertenciam à faixa etária entre 46 e 65 anos. No que se refere ao nível educacional, o grau de escolaridade mais prevalente foi o “fundamental incompleto”, que correspondeu a 49% da população. Além disso, verificou-se que a maioria dos indivíduos apresentava histórico de hábitos tabagistas e/ou etilistas, com 65,3% relatando que fuma ou já fumou, e 55,1% afirmando que consome ou já consumiu bebidas alcoólicas.

Ao comparar os participantes que testaram positivo para o DNA-HPV com a população geral, observou-se que ambos os grupos eram predominantemente masculinos. No entanto, o grupo positivo para HPV apresentou uma proporção ligeiramente menor de indivíduos brancos (70%) e

uma maior concentração na faixa etária de 46 a 65 anos (80%). Além disso, embora o nível educacional "fundamental incompleto" fosse o mais frequente em ambos os grupos, a proporção de indivíduos com esse nível de escolaridade era menor no grupo positivo para HPV (40%). Observou-se que 50% dos indivíduos positivos para DNA-HPV reportaram tabagismo e 40% relataram consumo de bebidas alcoólicas. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) na prevalência de HPV em relação às características sociodemográficas.

Tabela 1. Caracterização sociodemográfica de pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral e orofaringe submetidos à excisão cirúrgica do tumor no período de 2010 a 2020. (n=49)

Amostra total (n=49)			Amostra positiva para o DNA-HPV (n=10)		
Variáveis	n	%	n	%	p*
Sexo					0,971
Masculino	39	79,6	8	80	
Feminino	10	20,4	2	20	
Faixa etária (anos completos)					0,738
18 até 30	2	4,1	0	-	
31 até 45	2	4,1	0	-	
46 até 55	13	26,5	4	40	
56 até 65	20	40,8	4	40	
66 ou mais	12	24,5	2	20	
Cor da pele					0,055
Branca	43	87,8	7	70	
Não branca	6	12,2	3	30	
Escolaridade					0,909
Nenhuma	2	4,1	1	10	
Fundamental incompleto	24	49,0	4	40	
Fundamental completo	5	10,2	1	10	
Ensino médio	11	22,4	2	20	
Superior completo	1	2,0	0	-	
Superior incompleto	5	10,2	1	10	
Não informado	1	2,0	0	-	
Tabagismo					0,670
Sim	28	57,1	4	40	
Ex tabagista	4	8,2	1	10	
Nunca	10	20,4	3	30	
Não informado	7	14,3	2	20	

Etilismo					0,681
Sim	20	40,8	3	30	
Ex consumidor	7	14,3	1	10	
Nunca	13	26,5	3	30	
Não informado	9	18,4	3	30	

Fonte: elaborada pelo autor (2024).

A Tabela 2 apresenta as características clínicas e genótípicas dos 10 pacientes com CCE de orofaringe e cavidade oral que apresentaram positividade para o DNA-HPV, detectada por PCR. A maioria dos casos (40%) encontrava-se no estágio I, indicando um diagnóstico em fase inicial. A análise da genotipagem do HPV revelou a detecção de um ou mais subtipos virais em 90% das amostras positivas para HPV. Dentre os genótipos encontrados isoladamente, o subtipo 52 foi o mais prevalente (30%), seguido pelo 51 (20%). A coinfeção por múltiplos subtipos foi frequente, com destaque para a combinação dos subtipos 16 e 18, 33 e 45, e 52 e 58, cada uma presente em 10% dos casos. Um caso apresentou coinfeção tripla pelos subtipos 33, 45 e 58.

Dos 10 pacientes, 4 evoluíram para óbito, com tempo de evolução variável. Embora metade dos óbitos tenha ocorrido após um ano, 25% dos pacientes faleceram em menos de seis meses. Apesar da alta prevalência de coinfeção e da diversidade de subtipos identificados, não foi observada associação estatística entre o perfil genotípico e a sobrevivência dos pacientes ($p > 0,05$).

Tabela 2. Perfil clínico e subtipos de HPV observados em pacientes com CCE de cavidade oral e orofaringe. (n=10)

Amostra positiva para o HPV (n=10)		
Variáveis	n	%
Região anatômica acometida		
Língua	1	10
Orofaringe	5	50
Assoalho da boca	2	20
Palato duro	1	10
Cavidade oral (não especificado)	1	10
Estadiamento		
I	4	40
II	0	-
III	3	30
IV (IV A, IV B e IV C)	2	20
Não especificado	1	10

Óbito por câncer

Sim	4	40
Não	6	60
Não informado	0	-

Tempo de evolução para óbito

Inferior a 6 meses	1	25
Entre 6 meses e 1 ano	1	25
Superior a 1 ano	2	50

Subtipo do HPV

51	2	20
52	3	30
16 + 58	1	10
33 + 45	1	10
33 + 45 + 58	1	10
52 + 58	1	10
Outro	1	10

Fonte: elaborada pelo autor (2024).

Nas 43 amostras analisadas, a imunohistoquímica para p16 revelou superexpressão em 16,3% dos casos. No entanto, nenhum dos casos com superexpressão de p16 apresentou positividade para o DNA-HPV, impossibilitando avaliar a relação entre essas variáveis.

DISCUSSÃO

Além da detecção e genotipagem do DNA-HPV, este estudo também caracterizou o perfil sociodemográfico de pacientes com CCE de cavidade oral e orofaringe. A análise revelou proporções semelhantes de homens e mulheres nas amostras, com predominância masculina tanto na amostra total (79,6%) quanto na amostra positiva para o vírus (80%). Esses dados estão de acordo com a literatura, a qual indica que homens têm de 2 a 4 vezes mais chances de desenvolver câncer de cabeça e pescoço de modo geral, conforme demonstra o estudo de Miranda-Filho e Bray⁽¹⁰⁾. A maior prevalência de infecção por HPV em homens, evidenciada por Vani et al.⁽¹¹⁾, que reportaram um risco aproximadamente três vezes maior nesse sexo, contribui para a maior incidência de câncer de cabeça e pescoço. Embora a compreensão dos mecanismos biológicos subjacentes a essa diferença de gênero ainda seja limitada, fatores como comportamentos de risco, diferenças hormonais e genéticas podem estar envolvidos. Essa maior vulnerabilidade masculina reforça a importância de estratégias de prevenção direcionadas ao público masculino.

A análise da distribuição etária revelou que a faixa etária de 46 a 65 anos foi a mais acometida tanto no grupo geral quanto no grupo positivo para HPV. Essa predominância de casos em indivíduos mais idosos diverge dos achados de Barsouk et al.⁽¹²⁾, que relatam uma maior incidência de tumores relacionados ao HPV em adultos jovens. A menor frequência de casos em indivíduos com menos de 45 anos é um achado intrigante e pode estar relacionada com o tamanho pequeno da amostra, características do sistema imune ou outros fatores de risco, merecendo investigações adicionais.

A análise do perfil sociodemográfico dos pacientes revelou uma predominância de indivíduos caucasianos e com baixo nível educacional, tanto no grupo geral quanto no grupo positivo para HPV. Embora a maioria dos indivíduos positivos para o vírus pertença à população branca, essa proporção é menor do que a observada na população geral com CCE. Esses achados divergem parcialmente dos resultados de Pallavi e Salon⁽¹³⁾, que relatam uma associação entre o HPV e um nível socioeconômico mais elevado. A menor frequência de indivíduos com alto nível educacional em ambas as amostras pode refletir as características socioeconômicas da população estudada. Esses achados destacam a importância de considerar as particularidades de cada contexto ao analisar a associação entre o HPV e os determinantes sociais da saúde.

É de suma importância estabelecer a relação do desenvolvimento do CCE nos pacientes com seus hábitos tabagistas e etilistas, já que estes se constituem como os principais fatores de risco para o desenvolvimento da doença, amplamente estabelecidos na literatura^(4,11). Nesse contexto, é perceptível a alta porcentagem de pessoas que já entraram em contato com essas substâncias (consumidores ativos ou ex-consumidores) tanto na amostra total quanto na população positiva para o vírus e, embora não significativo, os percentuais foram menores dentre os pacientes com tumores HPV positivo. Conforme aponta o estudo de Du et al.⁽¹⁴⁾, é esperado um número alto de tabagistas e etilistas entre os pacientes negativos para o vírus. No entanto, espera-se um número baixo ou inexistente de tabagismo entre os pacientes que testam positivo para o DNA-HPV, o que difere dos achados deste estudo. É possível que o HPV e o tabagismo/etilismo interajam de forma sinérgica, aumentando o risco de desenvolvimento do câncer. No entanto, outros fatores, como a duração do consumo, o subtipo de HPV e o estágio da doença, podem influenciar essa relação. Além disso, a heterogeneidade dos tumores e as limitações do estudo, como o tamanho da amostra e a dependência do relato dos pacientes, devem ser consideradas ao interpretar esses resultados.

No que diz respeito à caracterização clínica das amostras positivas para DNA-HPV, observou-se que 40% dos pacientes foram diagnosticados em estágio I ou localizado, indicando um diagnóstico precoce. Em relação à localização anatômica, observou-se que 50% dos pacientes apresentaram tumores na orofaringe, enquanto os demais casos distribuíram-se por outros sítios da

cavidade oral. Esses achados corroboram os da literatura, que mencionam a menor recorrência dos tumores na cavidade oral em contraste com uma maior frequência na orofaringe^(4, 6, 15).

A análise da sobrevida dos pacientes revelou que 40% dos casos HPV-positivo evoluíram para óbito. A distribuição dos óbitos ao longo do tempo mostrou que 50% ocorreram após 12 meses, 25% antes de 6 meses e os demais entre 6 e 12 meses. A sobrevida média observada foi inferior à relatada por O'Sullivan et al.⁽¹⁶⁾. Essa discrepância pode ser explicada pela persistência do tabagismo em alguns pacientes, que é um fator de risco conhecido para pior prognóstico⁽¹⁷⁾. Além disso, o estágio da doença quando é feito o diagnóstico, o tratamento realizado, a presença de comorbidades e a heterogeneidade dos tumores relacionados ao HPV podem ter influenciado a sobrevida.

Em relação aos genótipos mais frequentes na amostra, foram encontrados resultados conflitantes com a literatura, já que em 85% dos casos é comum identificar os tipos 16 ou 18, conforme descrito em uma revisão sistemática⁽¹⁸⁾. No presente estudo, foram detectadas, de maneira isolada, infecções pelos genótipos 51 e 52 em metade dos casos, enquanto a coinfeção por mais de um subtipo ocorreu em 3 casos, em um caso infecção tripla e em apenas um caso coinfeção por HPV 16. A prevalência de genótipos atípicos pode estar relacionada a variantes regionais, como evidenciado por um estudo anterior realizado no mesmo município que identificou uma predominância de genótipos diferentes do tipo 16 e 18 em mulheres com lesões cervicais⁽¹⁹⁾. No entanto, a escassez de estudos sobre a prevalência de genótipos do HPV em tumores orais e de orofaringe em populações não europeias ou norte-americanas dificulta a comparação dos nossos resultados.

A detecção da atividade transcricional das oncoproteínas virais, como a p16, é fundamental para compreender o papel do HPV na carcinogênese e para guiar o manejo clínico. A superexpressão da p16 reflete a atividade do vírus em induzir a proliferação celular descontrolada e a inativação de genes supressores de tumor. As diretrizes do College of American Pathologists recomendam a imunohistoquímica para p16 como um marcador rotineiro para o HPV em CCE de orofaringe⁽²⁰⁾. Estudos como o de Priyatha et al.⁽²¹⁾ demonstraram que a p16 é um importante fator prognóstico, mas também destacaram que a detecção do HPV em casos p16 negativos está associada a um pior prognóstico. Embora a p16 seja um marcador confiável, a imunohistoquímica apresenta limitações, como a variabilidade interobservador e a possibilidade de falsos positivos ou negativos.

No presente estudo, o teste da p16 foi realizado em 43 pacientes, entre os quais havia tanto pacientes acometidos na orofaringe quanto na cavidade oral. Em 8 casos, foi detectada positividade para a superexpressão da proteína, mas em nenhum deles houve correspondência da detecção por

PCR e a imunohistoquímica. Nosso n amostral é limitado para fazer alguma inferência, mas tais resultados podem sugerir um comportamento variável da expressão de p16 entre os tumores dependendo da localização anatômica e positividade de HPV, como observado previamente por Priyatha et al⁽²¹⁾ e novos estudos com maior tamanho amostral são necessários para melhor entendimento dessa relação e de possíveis direcionamento para tratamento mais específicos. Adicionalmente, a não correspondência entre p16 e HPV pode ter ocorrido devido à degradação frequente do DNA em tecidos parafinizados, que pode ter subestimado a positividade de HPV nas amostras analisadas⁽⁷⁾.

O presente estudo, embora limitado pelo tamanho reduzido da amostra e pela dependência de dados secundários, contribui para o conhecimento sobre a prevalência do HPV relacionado ao câncer de cavidade oral e orofaringe na região de Passo Fundo. A análise estatística não revelou associações significativas entre as variáveis analisadas. Mesmo com limitações, os resultados deste estudo evidenciam a necessidade de ampliar as estratégias de prevenção primária contra o HPV na região, uma vez que a maior parte dos subtipos virais encontrados não são cobertos pela vacina disponibilizada pelo SUS (Sistema Único de Saúde). A implementação de vacinas que oferecem proteção contra um número maior de tipos virais e a realização de campanhas de vacinação direcionadas para grupos de maior risco são medidas que devem ser consideradas. Estudos futuros com um design mais robusto, como um estudo de coorte prospectivo com uma amostra maior e coleta de dados primários, são necessários para confirmar os achados deste estudo e identificar outros fatores de risco associados ao desenvolvimento de câncer em questão na região estudada.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos por meio deste estudo sugerem que o CCE em questão acomete mais homens, na sexta década de vida, com histórico de tabagismo e etilismo, e menor escolaridade. A positividade para o vírus do papiloma humano (HPV) foi detectada em aproximadamente 20% dos casos. Os subtipos de alto risco 51 e 52 foram os mais frequentes. A expressão da proteína p16 apresentou variabilidade entre os casos, sugerindo heterogeneidade na infecção por HPV e na progressão tumoral. Esses achados contribuem para a compreensão da epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço na região e destacam a importância do HPV na carcinogênese. É fundamental que futuras pesquisas investiguem a relação entre os diferentes subtipos de HPV e o desenvolvimento do câncer, bem como o papel de outros fatores de risco na progressão da doença.

Referências:

- 1 - Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, *et al.* World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention. Lyon, França: International Agency for Research on Cancer; 2020.
- 2- Bray F, Laversanne M, Sung H, *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229-263. doi: 10.3322/caac.21834.
- 3- Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Estimativa 2023: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2022. 160 p.
- 4- Pullos AN, Castilho RM, Squarize CH. HPV Infection of the Head and Neck Region and Its Stem Cells. *J Dent Res.* 2015;94(11):1532-43. doi: 10.1177/0022034515605456.
- 5-Mena M, Taberna M, Monfil L, *et al.* Might Oral Human Papillomavirus (HPV) Infection in Healthy Individuals Explain Differences in HPV-Attributable Fractions in Oropharyngeal Cancer? A Systematic Review and Meta-analysis. *J Infect Dis.* 2019;219(10):1574-1585. doi: 10.1093/infdis/jiy715.
- 6- Sabatini ME, Chiocca S. Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers. *Br J Cancer.* 2020;122(3):306-314. doi: 10.1038/s41416-019-0602-7.
- 7- Augustin JG, Lepine C, Morini A, *et al.* HPV Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: What Is the Issue? *Front Oncol.* 2020;10:1751. doi: 10.3389/fonc.2020.01751.
- 8 - Manos MM, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7;209-14.
- 9- Gupta I, Nasrallah GK, Sharma A, *et al.* Co-prevalence of human Papillomaviruses (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV) in healthy blood donors from diverse nationalities in Qatar. *Cancer Cell Int.* 2020 ;20:107. doi: 10.1186/s12935-020-01190-2.
- 10 - Miranda-Filho A, Bray F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. *Oral Oncol.* 2020; 102: 104551. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.104551
- 11 - Vani NV, Madhanagopal R, Swaminathan R, Ganesan TS. Dynamics of oral human papillomavirus infection in healthy population and head and neck cancer. *Cancer Med.* 2023;12(10):11731-11745. doi: 10.1002/cam4.5686
- 12- Barsouk A, Aluru JS, Rawla P, Saginala K, Barsouk A. Epidemiology, Risk Factors, and Prevention of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Medical Sciences.* 2023; 11(2):42. doi: 10.3390/medsci11020042.

- 13- Taneja P, Salomon MC. HPV and head and neck cancer: A comprehensive review. *Oral Oncology Reports*. 2024;10(1). doi: 10.1016/j.oor.2024.100451
- 14- Du E, Mazul AL, Farquhar D, *et al.* Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *Laryngoscope*. 2019;129(11):2506-2513. doi: 10.1002/lary.27807.
- 15- Farsi, NJ, El-Zein M, Gaied H, *et al.* Sexual behaviours and head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer epidemiology*. 2015;39(6): 1036-1046. doi: 10.1016/j.canep.2015.08.010
- 16- O'Sullivan B, Huang SH, Su J, *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*. 2016;17(4):440-451. doi: 10.1016/S1470-2045(15)00560-4
- 17- Fakhry C, Westra WH, Li S, *et al.* Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(4): 261-9. doi: 10.1093/jnci/djn011
- 18- Pinkiewicz M, Dorobisz K, Zatoński T. Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. Where are We Now? A Systematic Review. *Cancer Manag Res*. 2022; 14;14:3313-3324. doi: 10.2147/CMAR.S379173.
- 19- Bozza G. HPV de alto risco em mulheres atendidas em ambulatório do Sistema Único de Saúde do Norte gaúcho. Passo Fundo. Monografia [Graduação em Medicina] - Universidade Federal da Fronteira Sul; 2023.
- 20- Lewis JS, Beadle B, Bishop JA, *et al.* Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2018; 142 (5): 559–597. doi: 10.5858/arpa.2017-0286-CP.
- 21- Priyatha V, Gupta H, Narsapuram P, *et al.* Significance of p16 in Site-Specific Human Papillomavirus-Positive and Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *Cureus*. 2024. 16(7). doi 10.7759/cureus.63594.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Grande parte das práticas em saúde baseia-se em evidências científicas, e compreender minimamente o funcionamento do processo de sua produção é de grande relevância para os futuros profissionais da área. Por essa razão, defendo a existência de um componente curricular voltado ao Trabalho de Curso em uma faculdade de Medicina, ainda que essa experiência nem sempre seja bem vista por todos os alunos. Pessoalmente, houve momentos de estresse ao longo da disciplina, mas considero que seja uma parte essencial da curva de aprendizado. Atualmente, sou grato pelo conhecimento adquirido em produção científica e pela oportunidade de aplicar técnicas laboratoriais que não teria explorado em outras etapas do curso.

Em relação aos resultados obtidos neste estudo, observamos dados que divergem da literatura, uma vez que a maioria dos genótipos de HPV identificados foi distinta dos tipos 16 e 18, que são os mais frequentemente associados aos carcinomas de células escamosas (CCE) de cabeça e pescoço. Como discutido no artigo, esse achado pode estar relacionado a variantes locais da região noroeste do Rio Grande do Sul. No entanto, é difícil estabelecer comparações com a literatura nacional devido à sua escassez nesse tema. Desse modo, o estudo destaca a necessidade de mais pesquisas científicas nessa área. Além disso, ele contribui para a formulação de novas políticas de prevenção primária, visto que a vacina atualmente disponível no SUS não combate os genótipos encontrados neste estudo.