

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PRISCILA MARINHO DE ABREU

**HPV E EXPRESSÃO DE p16 COMO BIOMARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA
CAVIDADE BUCAL**

VITÓRIA
2015

PRISCILA MARINHO DE ABREU

**HPV E EXPRESSÃO DE p16 COMO BIOMARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA
CAVIDADE BUCAL**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dr^a Sandra Ventorin von Zeidler

Co-Orientadora: Prof. Dr^a Sônia Alves Gouvêa

VITÓRIA

2015

PRISCILA MARINHO DE ABREU

**HPV E EXPRESSÃO DE p16 COMO BIOMARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA
CAVIDADE BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 20 de março de 2015.

Prof. Dr^a Sandra Ventorin von Zeidler
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof. Dr^a Sônia Alves Gouvêa
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-Orientadora

Prof. Dr^a Liliana Cruz Spano
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof. Dr. Elismauro Francisco de
Mendonça
Universidade Federal de Goiás

VITORIA

2015

AGRADECIMENTOS

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo;

Às professoras Sandra e Sônia, por abrir as portas do laboratório, por toda orientação, disponibilidade e suporte;

A todos os alunos de iniciação científica do Laboratório de Patologia Molecular, à Karine e ao Wender, por toda ajuda com experimentos e troca de experiências;

Às professoras: Danielle Camisasca e Maria Carmen Santos, pela ajuda com os gráficos e cálculos de sobrevivência e pelo espaço cedido na patologia do HUCAM;

Ao Laboratório de Virologia, à professora Liliana Cruz Spano e às alunas Lays e Luciana, pela instrução e suporte quanto às técnicas utilizadas no laboratório;

Às técnicas Fernanda e Luciene pela ajuda com o corte dos blocos;

Às agências de apoio e financiamento: CAPES e FAPES.

RESUMO

Biomarcadores de progressão tumoral são importantes na determinação do prognóstico e resposta ao tratamento em carcinoma de células escamosas da cavidade bucal. Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência de infecção pelo HPV e a expressão de p16 como biomarcador de prognóstico em carcinoma de células escamosas da cavidade bucal. Dados clínico-patológicos e tecido tumoral de 90 indivíduos com carcinoma de células escamosas da cavidade bucal foram obtidos por entrevista e análise de prontuários. Detecção de HPV foi realizada à partir de amostras de tecido tumoral por PCR utilizando o conjunto de primers PGMY09/11. A seguir, as mesmas amostras foram submetidas à PCR com os *primers* MY09/11 e *nested* PCR com os *primers* GP5+/6+. Expressão de p16 foi detectada por imunohistoquímica. Análise estatística foi feita através de associação de variáveis, utilizando o teste de qui-quadrado e exato de Fisher. Sobrevida doença-específica (SDE) e sobrevida livre de doença (SLD) foram estimadas usando método de Kaplan-Meier. Comparação entre as curvas de sobrevida foram realizadas com o teste Log-Rank. Comparação entre status da infecção pelo HPV e expressão de p16 foram analisadas pelo teste Cox. Todos os testes com $P \leq 0.05$ foram considerados significantes. A frequência de infecção pelo HPV na população estudada foi de 3,70% detectadas apenas com a *nested* PCR. Expressão de p16 foi observada em 21,87% das amostras analisadas. A SDE foi de 25,5 meses (95% IC = 20,03 - 31,00), enquanto a SLD foi de 30 meses (95% IC = 25,63 - 34,48). Maior SDE foi observada em indivíduos com tumores em estágio inicial (I-II) ($P=0,001$), tumores < 2cm ($P=0,001$), sem metástase em linfonodos regionais ($P=0,006$) e aqueles submetidos a tratamento cirúrgico ($P<0,0001$). Em conclusão, o *status* da infecção pelo HPV não mostrou-se um bom marcador de prognóstico e parece não ser determinante na tumorigênese em CCE da cavidade bucal, uma vez que apresentou baixa frequência de infecção. A expressão de p16 não foi um indicador determinante da presença de HPV nas amostras estudadas e um maior número de casos é necessário para avaliar sua aplicabilidade como marcador de prognóstico na população estudada.

Palavras-Chave: Carcinoma de células escamosas. Cavidade bucal. HPV. p16.

ABSTRACT

Tumor progression biomarkers are important in determining prognosis and treatment response in squamous cell carcinoma of the oral cavity. This study aimed to evaluate the frequency of HPV infection and p16 expression as a biomarker of prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. Clinicopathological data and tumor tissue of 90 patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity were obtained by interview and review of medical records. HPV detection was performed starting from tumor tissue samples by PCR using the primer set PGMY09/11. Next, the same samples were subjected to PCR with primers MY09 / 11 primers and nested PCR with GP5+/6+ primers. P16 expression was detected by immunohistochemistry. Statistical analysis was performed using variable association, using the chi-square and Fisher exact test. Disease-specific survival (DSS) and disease-free survival (DFS) were estimated using Kaplan-Meier. Comparison between the survival curves were performed using the log-rank test. Comparison status of HPV infection and p16 expression were analyzed by Cox test. All tests with $P \leq 0,05$ were considered significant. The frequency of HPV infection in this population was 3,70% detected only with nested PCR. p16 expression was observed in 21.87% of the analyzed samples. The DSS was 25.5 months (95% CI = 20.03 to 31.00), while the DFS was 30 months (95% CI = 25.63 to 34.48). Most DSS was observed in subjects with initial stage tumors (I-II) ($P=0,001$), tumor <2 cm ($P=0,001$), without regional lymph node metastasis ($P=0,006$) and those undergoing surgical treatment ($P<0,0001$). In conclusion, the status of HPV infection not proved to be a good prognostic marker and does not seem to be decisive in tumorigenesis in SCC of the oral cavity, since it showed low frequency of infection. The expression of p16 was not a key indicator of the presence of HPV in all samples and a greater number of cases it is necessary to evaluate its applicability as a prognostic marker in this population.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Oral cavity. HPV. p16.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo do genoma do HPV. Fonte: Muñoz et al.(2006).13
- Figura 2.** Infecção por HPV e integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira. Fonte: Adaptado de WOODMAN et al., 2007..... 15
- Figura 3.** Relação entre as proteínas p16 e pRB no controle do ciclo celular. (A) Esquema simplificado; (B) Ação de p16 e pRB em células não proliferativas e proliferativas. Fonte: Adaptado de Alberts et al.(2006). 17
- Figura 4.** Algoritmo representativo das etapas de detecção do HPV em amostras de CCE da cavidade bucal contendo o número de amostras analisadas e o resultado parcial simplificado.37
- Figura 5.** Produtos da amplificação por PCR do gene da β -globina humana. Fotografia da eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular (1); Controle positivo (2); Controle negativo (3); amostras com qualidade satisfatória (4 e 5)38
- Figura 6.** Detecção de HPV por multiplex PCR utilizando o conjunto de primers PGMY09/11. Fotografia da eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. Marcador de peso molecular (1); Controle positivo (2); Controle negativo (3). n=8138
- Figura 7.** Detecção de HPV por nested PCR utilizando os primers MY09/11 e GP5+/6+. Fotografia da eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% mostrando o produto final da nested PCR. Marcador de peso molecular (1); Controle positivo (2); Controle negativo (3); Amostras HPV negativas (4, 5 e 6). n=8139
- Figura 8.** Fotomicrografia representativa da expressão de p16 (imunohistoquímica). (A, B): CCE da cavidade bucal com intensa expressão de p16. (C, D): CCE da cavidade bucal com ausência de expressão de p16. Aumento x200 (A e C); Aumento x400 (B e D).40
- Figura 9.** Sobrevida Doença-Específica segundo modalidade terapêutica instituída (Cirurgia; Cirurgia + radioterapia adjuvante; Quimiorradioterapia). Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. As setas na curva representam dados censurados. Rxt: Radioterapia; qt: quimioterapia.46
- Figura 10.** Sobrevida Livre de Doença. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. As setas na curva representam dados censurados.....47

Figura 11.Sobrevida Doença-Específica (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) segundo a expressão de p16 avaliada pela técnica de IHC. Probabilidade de sobrevivida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. As setas na curva representam dados censurados. A sobrevivida foi calculada apenas incluindo os casos submetidos à técnica de imunohistoquímica47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados para analisar a qualidade do DNA genômico e na detecção do HPV.	27
Tabela 2 Características clínicas da população analisada e status da infecção por HPV (n=81).	34
Tabela 3. Associação entre características clínicas tumorais, tamanho do tumor e metástase em linfonodos regionais, fatores de risco (tabagismo e etilismo) e infecção por HPV.....	36
Tabela 4. Relação entre estágio, modalidade terapêutica instituída e resposta ao tratamento.	42
Tabela 5. Análise da sobrevida doença-específica e sua relação com as variáveis clínico-epidemiológicas e expressão de p16 (n = 58).....	44
Tabela 6. Modelo de Cox para Sobrevida Doença-Específica.....	47

LISTA DE SIGLAS

CCE	Carcinoma de Células Escamosas
HPV	Papilomavírus Humano (do inglês <i>Human Papillomavirus</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
URR	Região Reguladora (do inglês <i>Upstream Regulation Region</i>)
CDK	Quinase ciclina-dependente (do inglês <i>Cyclin-dependent Kinase</i>)
CDKI	Inibidor de quinase ciclina-dependente (do inglês <i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor</i>)
pRB	Proteína do Retinoblastoma
IHC	Imunohistoquímica (do inglês <i>Imunohistochemistry</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate</i>)
DAB	3,3-diaminobenzidina
PBS-BSA	Tampão fosfato salino – Soro Albumina Bovina (do inglês <i>Phosphate Buffered Saline - Bovine Serum Albumine</i>)
TBS	Tampão Tris Salino (do inglês <i>Tris Buffered Saline</i>)
pb	par de base
SDE	Sobrevida doença-específica
SLD	Sobrevida livre de doença

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO:.....	10
1.1	Epidemiologia.....	10
1.2	Papilomavírus Humano	12
1.3	P16, ciclo celular e HPV.....	16
1.4	Detecção do HPV	18
1.5	Prognóstico em pacientes com CCE de cavidade bucal.....	19
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos.....	22
3	METODOLOGIA.....	23
3.1	Casuística	23
3.2	Detecção de HPV.....	24
3.2.1	<i>Extração de DNA e Avaliação da Viabilidade da Amostra</i>	24
3.2.2	<i>PCR PGMY09/11</i>	25
3.2.3	<i>PCR MY09/11 e nested PCR GP5+/6+</i>	25
3.2.4	<i>Sequenciamento do HPV</i>	27
3.2.5	<i>Análise da expressão de p16</i>	28
3.2.6	<i>Interpretação dos resultados dos testes para detecção de HPV</i>	30
3.3	Estudo de Sobrevida	30
3.4	Análise estatística.....	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5	CONCLUSÃO.....	50
6	REFERÊNCIAS.....	51

1 INTRODUÇÃO:

1.1Epidemiologia

O câncer é considerado um problema de saúde pública mundial. Para o ano de 2012, foi estimada para o câncer de lábio e cavidade bucal uma incidência equivalente à 299.051 novos casos, incluindo homens e mulheres, com 145.353 óbitos (IARC; WHO, 2012).

No Brasil foram estimados para 2014 a ocorrência de 15.290 novos casos de câncer da cavidade bucal e lábio (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2014).

Na região sudeste, para o ano de 2014, a estimativa indicou que o câncer de cavidade bucal foi o quarto mais frequente em homens e o décimo em mulheres. No estado do Espírito Santo, registrou-se a ocorrência de 400 novos casos neste sítio anatômico (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2014).

Dentre os tumores mais frequentes na cavidade bucal, está o carcinoma de células escamosas (CCE), com origem em epitélio de revestimento, representando mais de 95% dos casos (BRENER et al., 2007; GUPTA; METGUD, 2013).

Os principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do câncer da cavidade bucal são: tabagismo e etilismo, que se destacam por serem mais estudados e possivelmente relacionados ao desenvolvimento do câncer de cavidade bucal (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2014). Enquanto o tabaco contém nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos carcinogênicos genotóxicos, responsáveis pela alteração do perfil molecular e pela indução de mutações nas células o álcool atua como solvente, facilitando a exposição da mucosa a agentes carcinogênicos, o que resulta no aumento da absorção destes carcinógenos. Além disso, o acetaldeído, um dos metabólitos do álcool, pode formar adutos de DNA, interferindo na síntese e reparo do DNA. Quando utilizados concomitantemente, álcool e tabaco, produzem um efeito

sinérgico, aumentando o risco de transformação celular, ou seja, a tumorigênese. O tabaco associado ao álcool é responsável por aumentar em 40 vezes o risco de CCE de cabeça e pescoço (GALBIATTI et al., 2013). O risco também aumenta proporcionalmente ao tempo de tabagismo, quantidade de cigarros fumados e frequência de ingestão de bebidas alcoólicas (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2014).

Nos últimos anos, a participação do Papilomavírus Humano (HPV) na patogênese dos tumores de cabeça e pescoço tem sido sugerida em vários estudos, sobretudo relacionada ao carcinoma de células escamosas de orofaringe (COMBES; FRANCESCHI, 2014; WESTRA, 2009; ZARAVINOS, 2014).

Alguns estudos têm sustentado a hipótese da participação de outros fatores de risco, além do tabaco e do álcool, relacionados ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Esta hipótese é sustentada pois na última década houve uma redução no consumo de tabaco (IARC; WHO, 2012) no entanto, não foi observada redução na incidência dos tumores de cabeça e pescoço. Pelo contrário, tem sido observado um aumento na incidência dos tumores de orofaringe nos últimos 20 anos, o que pode estar relacionado à infecção pelo HPV (CHATURVEDI et al., 2013; OGUEJIOFOR et al., 2013).

Outro aspecto que tem atraído a atenção nos últimos anos é a mudança no perfil dos indivíduos com tumores de cabeça e pescoço, com aumento na incidência de tumores em indivíduos mais jovens, com idade inferior a 45 anos, sem história de consumo de álcool e tabaco. A relação homem/mulher afetados pela doença é de 3:1 (WESTRA, 2009), entretanto as taxas de incidência relacionadas à infecção pelo HPV vêm aumentando entre a população de adultos jovens em ambos os sexos, sobretudo em carcinoma de células escamosas de orofaringe (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2014).

Apesar das evidências da participação do HPV em tumores de cabeça e pescoço, ainda existem poucos estudos sobre a frequência de infecção pelo HPV em câncer da cavidade bucal. Grande parte dos estudos relacionando infecção por HPV em câncer de cabeça e pescoço avalia tumores de orofaringe. Ainda, os mecanismos envolvidos

na patogênese do câncer de cabeça e pescoço relacionados ao HPV não estão bem esclarecidos.

A frequência com que o HPV é detectado em CCE de cavidade bucal é bastante variável, no mundo e no Brasil. Estudo realizado no Reino Unido revelou uma baixa frequência de HPV, equivalente a menos de 2% da população estudada (LOPES et al., 2011); na Índia, foi publicado um estudo mostrando que a frequência de HPV em CCE de cavidade bucal foi de 46% (CHAKROBARTY et al., 2014); e nos Estados Unidos, estudo realizado por Linger e colaboradores (2013) detectou a presença do HPV em 5,9% dos tumores analisados.

No Brasil, estudos realizados para detectar a frequência de infecção pelo HPV em carcinoma de células escamosas da cavidade bucal mostraram frequência de 19,2%, a maioria referente ao HPV-16 (KAMINAGAKURA et al., 2012), frequência de 6,6%, com metade dos casos positivos referentes ao HPV-16 (LÓPEZ et al., 2014), e até mesmo ausência de HPV (SPÍNDULA-FILHO et al., 2011).

A detecção do carcinoma de células escamosas da cavidade bucal nas fases iniciais da tumorigênese aumenta as chances de cura. No entanto, a maioria dos casos apresenta-se em estágio avançado no momento do diagnóstico. Embora tenham ocorrido avanços no tratamento, nas últimas décadas a taxa de sobrevida não aumentou significativamente, mantendo-se entre 50-55%, em um período de 5 anos. Fatores biológicos envolvidos na progressão e disseminação local desta neoplasia ainda não estão completamente esclarecidos e portanto, o estudo de biomarcadores de progressão tumoral poderá auxiliar na determinação do prognóstico e resposta ao tratamento em pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade bucal.

1.2 Papilomavírus Humano

O papiloma vírus humano (HPV) é um vírus da família *Papillomaviridae*, grupo de pequenos vírus não envelopados, epiteliotrópicos, de simetria icosaédrica. O virion do

HPV tem cerca de 55 nm de diâmetro e apresenta genoma de DNA dupla fita circular, com cerca de 8.000 pares de bases. (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013; SIMONATO; MIYAHARA, 2007)

O genoma do HPV possui cerca de oito genes que podem ser funcionalmente divididas em três regiões: região precoce (composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6, E7), responsável pela codificação de proteínas necessárias para replicação viral e transcrição; região tardia (composta pelos genes L1 e L2) que codifica as proteínas estruturais do capsídeo; e uma região reguladora (URR – Upstream Regulation Region), a qual apresenta elementos necessários para a replicação do DNA viral e regulação da transcrição (Figura 1)(BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013; FERRAZ et al., 2012; MUÑOZ et al., 2006).

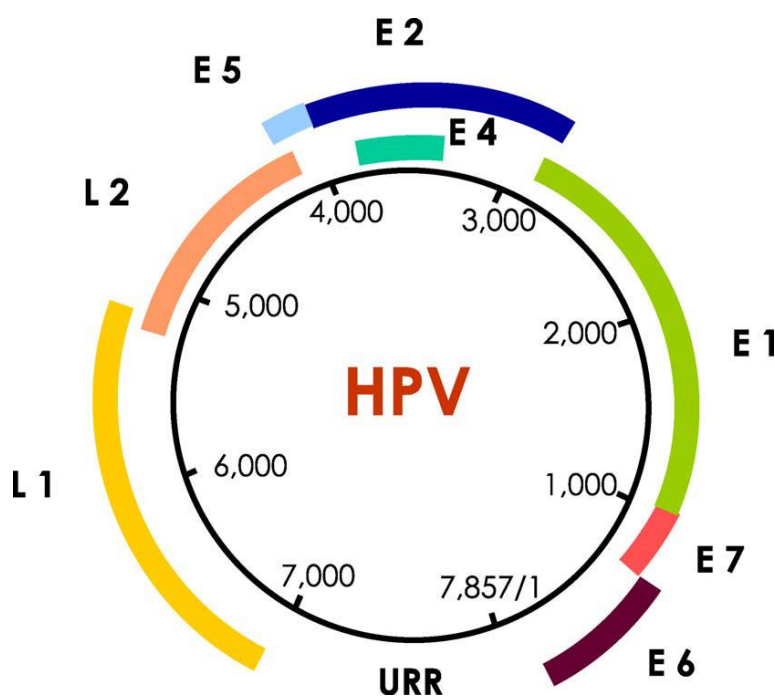


Figura 1. Esquema representativo do genoma do HPV. Fonte: Muñoz et al.(2006)

Os genes E1 e E2 têm a função de codificar proteínas essenciais para replicação do DNA viral e controle da transcrição gênica viral, sendo os primeiros genes expressos. E1 tem função específica de replicação viral, com seu produto apresentando atividade ATPase e DNA helicase e ligando-se na origem de replicação do DNA viral, sendo essencial para a replicação do vírus; E2 é responsável por codificar uma proteína que

age como fator regulador da transcrição de E6 e E7; E4 é responsável pela alteração no citoesqueleto, maturação e liberação de novas partículas virais, sendo expresso em estágios mais avançados da infecção; E5 estimula a proliferação e transformação celular através do aumento da transdução de sinal intracelular, que ocorre por meio de fatores de crescimento; E6 e E7 são responsáveis pela amplificação do genoma viral, mecanismo este, dependente da expressão dos genes anteriores. As regiões L1 e L2 codificam, respectivamente, proteínas principais e secundárias do capsídeo nas etapas finais da replicação viral (FERRAZ et al., 2012; SIMONATO; MIYAHARA, 2007; SOUTO, 2005).

O potencial oncogênico do HPV é dependente do comportamento do genoma viral na célula hospedeira. Assim, os tipos de HPV considerados de baixo risco oncogênico mantêm seu DNA em forma circular e episomal, enquanto os de alto risco oncogênico integram seu DNA ao genoma da célula hospedeira (FERRAZ et al., 2012).

Cerca de 18 tipos de HPV são classificados como de alto risco oncogênico: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 41, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82 (MUÑOZ et al., 2006). Eles estão relacionados ao desenvolvimento de tumores, como câncer de colo do útero (FERRAZ et al., 2012; SHENG et al., 2013; SIMONATO; MIYAHARA, 2007; SKINNER et al., 2014), trato ano-genital (KAMINAGAKURA et al., 2012; MARUR et al., 2010; ZARAVINOS, 2014) e orofaringe (CHATURVEDI et al., 2013; LÓPEZ et al., 2014; MUÑOZ et al., 2006). Sendo assim, os fatores envolvidos na carcinogênese estão relacionados à afinidade do HPV às células epiteliais e ao seu potencial oncogênico (MARTÍN-HERNÁN et al., 2013).

As células alvo do HPV são as células indiferenciadas proliferativas da camada basal do epitélio escamoso. O vírus penetra nestas células após perda da solução de continuidade do tecido, quando então estabelece-se uma relação entre o ciclo viral e a diferenciação da célula infectada (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013).

O DNA na forma episomal é responsável apenas pela replicação viral. No ciclo normal de infecção por HPV, há um baixo número de cópias do DNA viral na forma episomal e baixo nível de expressão de E6, E7, E1 e E2, suficientes apenas para a manutenção do genoma viral. A expressão dos genes do HPV é regulada e

dependente da diferenciação das células infectadas pelo HPV e sua migração no epitélio. Para as partículas virais serem produzidas, ocorre a amplificação do genoma do HPV e montagem das partículas nas camadas médias e superiores do epitélio. Os genes L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo viral e são expressos nos grupos de células com maior expressão de E4, responsável por alterar o citoesqueleto, maturação e replicação viral. A montagem dos vírus e o empacotamento ocorrem na camada superficial do epitélio e a formação e liberação de partículas virais completas ocorrem na superfície do epitélio sem que haja lise celular (FERRAZ et al., 2012).

No entanto, o desenvolvimento de neoplasias está associado à perda da regulação do ciclo celular, o que é frequentemente observado em infecções persistentes por HPV de alto risco oncogênico, onde é observada a integração do genoma viral ao da célula hospedeira, em vez de manter o DNA na forma epissomal, conforme exemplificado na Figura 2 (FERRAZ et al., 2012).

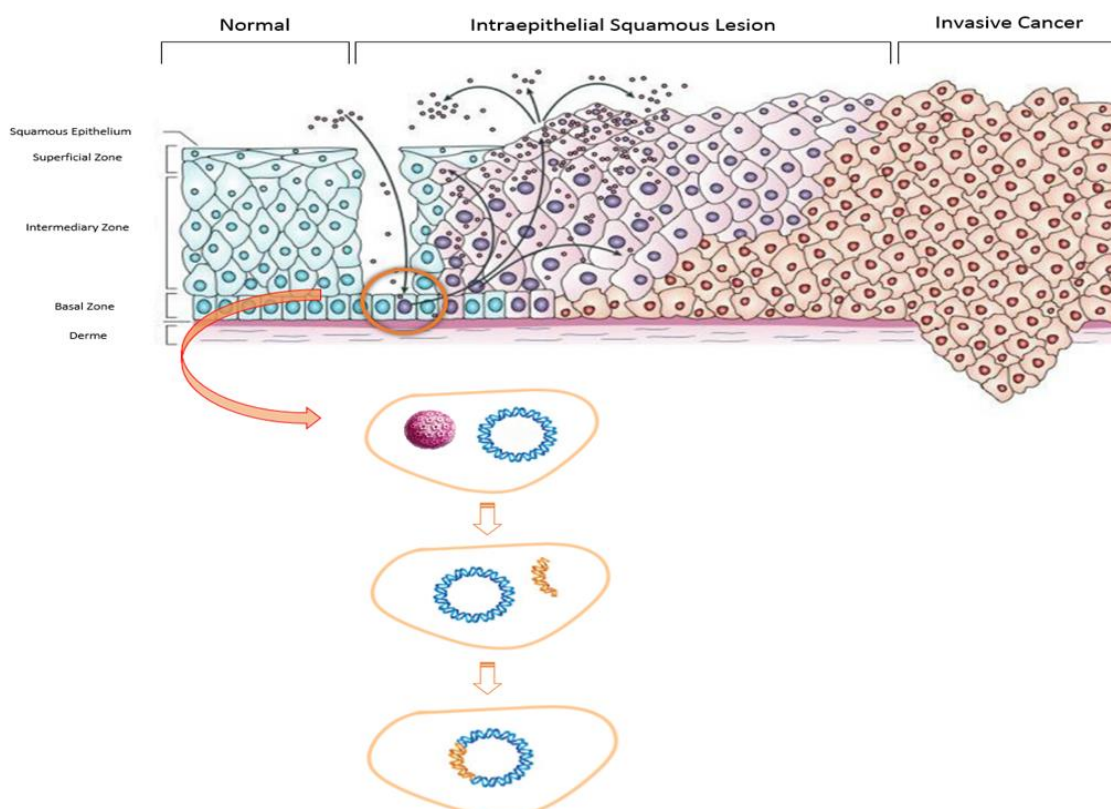


Figura 2. Infecção por HPV e integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira. Fonte: Adaptado de WOODMAN et al., 2007.

No momento da integração do genoma viral ao genoma da célula hospedeira, o DNA viral é clivado na região onde localizam-se os genes E1/E2, interferindo assim no

controle transcricional exercido por E2. O produto do gene E2 é um fator que regula a transcrição dos oncogenes E6 e E7, sendo este controle perdido em decorrência da clivagem, provocando um aumento da expressão dessas proteínas (SIMONATO; MIYAHARA, 2007; SOUTO, 2005).

A ação de E6 e E7 no ciclo celular é determinante para a carcinogênese viral, uma vez que estimula a proliferação e transformação celular a partir da interferência no ciclo celular (FERRAZ et al., 2012). A ativação da enzima telomerase, determinada por E6, promove a imortalização de queratinócitos, caracterizando importante evento na carcinogênese (GUPTA; METGUD, 2013).

A participação do HPV na tumorigênese tem sido descrita mais detalhadamente na patogênese dos tumores do colo de útero onde a infecção persistente pelo HPV de alto risco é responsável pelo desenvolvimento da maior parte dos cânceres, sendo os subtipos 16 e 18 os mais prevalentes, com cerca de 70% dos casos (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013). No entanto, quando trata-se de câncer de cabeça e pescoço, sobretudo aqueles da cavidade bucal, estudos têm mostrado que o HPV ainda não tem sua participação bem estabelecida na patogênese destes tumores (FERRARO et al., 2011; LOPES et al., 2011).

1.3 P16, ciclo celular e HPV

A progressão do ciclo celular a partir da fase G1 é regulada por ciclinas, através da formação de complexos com proteínas quinase ciclina-dependentes (CDK). Esses complexos ciclina-CDK têm a função de regular a fosforilação de proteínas relacionadas à progressão do ciclo celular. O gene P16INK4a codifica a proteína p16 a qual regula negativamente a progressão do ciclo celular, atuando como inibidor de CDK 4/6 e, desta forma, bloqueando a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRB). A pRB, por sua vez, exerce efeitos antiproliferativos por meio do controle da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Em sua forma ativa, hipofosforilada, pRb está ligada ao fator de transcrição E2F, bloqueando sua ação e mantendo a célula

na fase G1. Quando fosforilada, a pRB torna-se inativa e libera o fator E2F, o qual induz a progressão do ciclo celular para a fase S (FERRAZ et al., 2012; OGUEJIOFOR et al., 2013; PANNONE et al., 2012).

A oncoproteína viral E7 inibe a atividade da pRB por ligar-se a esta proteína, liberando o fator E2F, desencadeando o processo de replicação do DNA e aumentando a proliferação das células do epitélio infectado. O gene P16INK4a, por sua vez, tem sua expressão controlada por *feedback* negativo exercido pela pRB, conforme figura 3. Assim, a inativação de pRB por E7 resulta no acúmulo de p16 nas células infectadas. A oncoproteína viral E7 também é capaz de ligar-se a p21 e p27, as quais também atuam como CDKIs, o que contribui para o descontrole do ciclo celular em diferentes pontos de checagem (FERRAZ et al., 2012; OGUEJIOFOR et al., 2013; PANNONE et al., 2012).

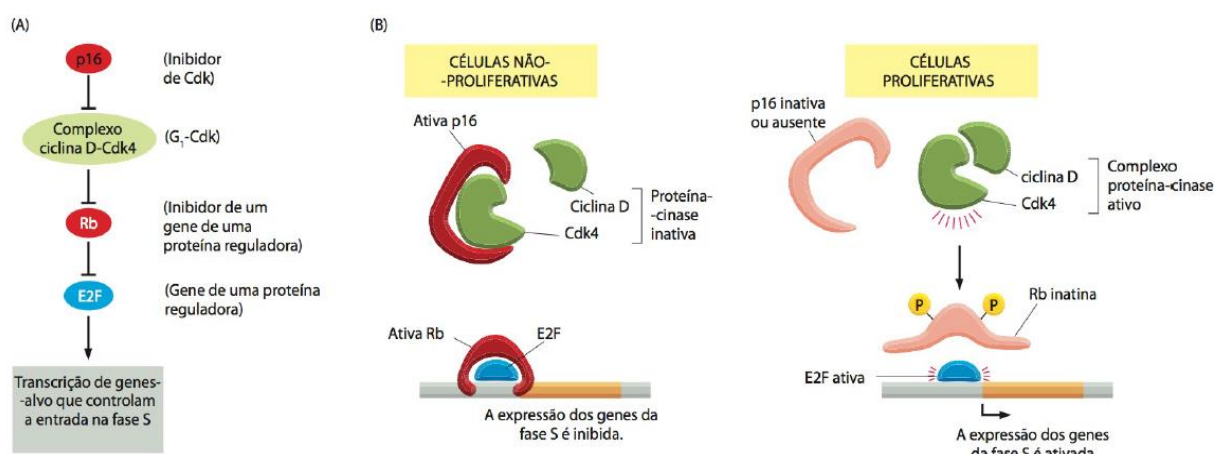


Figura 3. Relação entre as proteínas p16 e pRB no controle do ciclo celular. (A) Esquema simplificado; (B) Ação de p16 e pRB em células não proliferativas e proliferativas. Fonte: Adaptado de Alberts et al.(2006).

O gene supressor de tumor P53 é responsável por ativar genes envolvidos no controle do ciclo celular, reparo do DNA e indução da morte celular por apoptose. Desta forma, atua impedindo a progressão de células com danos genéticos no ciclo celular, favorecendo mecanismos de reparo do DNA e, caso o reparo não seja efetivo, ativa mecanismos que induzem à apoptose. O gene P16INK4a, cuja transcrição é ativada por p53, realiza a parada do ciclo celular, conforme descrito anteriormente; GADD45 pode então reparar o dano ao DNA; e o gene BAX induz apoptose nas células cujo

dano ao DNA foi irreversível. A oncoproteína viral E6 liga-se à p53, promovendo sua degradação por proteassomo, causando instabilidade cromossomal, imortalização e proliferação anormal das células transformadas, favorecendo assim o desenvolvimento tumoral. Além disso, a oncoproteína E6 é capaz de degradar a proteína BAX em queratinócitos humanos, impedindo a apoptose (FERRAZ et al., 2012; PANNONE et al., 2012).

Desta forma, compreendendo os mecanismos de modificação do ciclo celular promovidos pelo HPV, tem sido proposto utilizar p16 como um indicador da participação viral na carcinogênese dos tumores de origem epitelial. No entanto, até o momento não há um consenso estabelecido para esta aplicação e alguns estudos têm mostrado não existir uma correlação absoluta entre a presença do HPV e o acúmulo de p16 (WENDT; ROMANITAN; ANDERS, 2013; ZARAVINOS, 2014).

1.4 Detecção do HPV

A participação do HPV em CCE de cabeça e pescoço, de forma geral, tem sido intensamente estudada nos últimos anos. No entanto, as taxas de detecção do DNA viral são bastante variáveis, dependendo do método de detecção utilizado.

Os pares de *primers* MY09/MY11 e GP5+/GP6+, usados na Reação da Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção do HPV, são *primers* consenso degenerados para a identificação de uma região conservada de L1, gene responsável pela produção de proteínas principais do capsídeo viral do HPV. Os *primers* MY09/MY11 são desenhados para identificação de apenas 5 tipos de HPV de alto risco (6, 11, 16, 18 e 33) e são utilizados inicialmente para amplificar, pela técnica de PCR, um fragmento do genoma viral correspondente a L1. A partir do produto desta reação, é feita uma nova amplificação (nested PCR) utilizando os *primers* GP5+/GP6+, obtendo-se assim um fragmento menor, o qual será posteriormente detectado por eletroforese em gel (GRAVITT et al., 2000).

O conjunto de *primers* PGMY09/11 consiste em uma mistura de 18 *primers*, permitindo a amplificação de mais de 30 subtipos de HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 40, 45, 51, 52, 56, 59, 39, 42, 53, 54, 55, 58, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, IS39, CP8304, CP6108, MM4, MM7, MM8. O resultado é obtido em apenas uma PCR (GRAVITT et al., 2000).

A detecção de p16 no tecido tumoral, utilizando imunohistoquímica (IHC), tem sido amplamente utilizada como indicador da presença do HPV em tumores de cabeça e pescoço. Assim, por utilizar tecido fixado e incluído em parafina, tem grande aplicação clínica, sendo atualmente utilizado na rotina de alguns centros como método de *screening*, seguido da identificação molecular do vírus em casos onde é observado um acúmulo da proteína (p16) no tecido tumoral (SCHACHE et al., 2013). No entanto, ainda existem dúvidas quanto ao valor da utilização da imunohistoquímica para detecção de p16 como método de triagem para detecção de HPV, em relação à sensibilidade e especificidade do teste, quando usado sem subsequente detecção molecular do DNA viral.

Assim, atualmente, a detecção do DNA viral associado ao acúmulo de p16 por imunohistoquímica no tecido tumoral é frequentemente considerado como indicativo de HPV funcionalmente ativo nestes tumores (OGUEJIOFOR et al., 2013b; PANNONE et al., 2012; WENDT et al., 2013).

Com base em estudos, a National Comprehensive Cancer Network, USA; College of American Pathologists; ENT UK; e Royal College of Pathologists, UK, definiram um protocolo baseado em evidências clínicas, no qual recomenda-se o teste de detecção de HPV, utilizando imunohistoquímica para avaliar p16 seguido de detecção molecular em casos considerados p16 positivos, em CCE de cabeça e pescoço, mais especificamente para os tumores localizados em orofaringe e os metastáticos de origem desconhecida (NCCN, 2014; ROBINSON et al., 2012).

1.5 Prognóstico em pacientes com CCE de cavidade bucal

O tratamento do CCE de cabeça e pescoço é realizado basicamente considerando 3 modalidades: cirurgia, cirurgia com radioterapia adjuvante e quimiorradioterapia. A decisão sobre a escolha da modalidade terapêutica a ser instituída depende de fatores como a ressecabilidade e localização do tumor, além da viabilidade da abordagem terapêutica, visando à preservação do órgão atingido e estruturas adjacentes (GALBIATTI et al., 2013). Outro importante determinante da decisão terapêutica é o estadiamento clínico do tumor. No Brasil adota-se a classificação TNM para os tumores primários, publicada pela International Union Against Cancer (UICC) cuja terminologia é amplamente utilizada mundialmente. Na classificação TNM são considerados três aspectos básicos, sendo eles o tamanho tumor primário (T), metástase em linfonodos regionais (N) e metástase à distância (M) (BERNARDO; NUNES, 2010; BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Cada uma destas variáveis é subdividida em números e letras, os quais, em conjunto, determinam o estágio clínico do tumor, o qual tem sido extensamente utilizado como padrão para guiar a conduta terapêutica em pacientes oncológicos.

A modalidade terapêutica comumente instituída em indivíduos com carcinoma de células escamosas da cavidade bucal em fase inicial (estádios I e II) é a ressecção cirúrgica isolada ou associada à radioterapia adjuvante. Assim, a cirurgia é o pilar do tratamento pela facilidade de acesso à cavidade bucal e morbidade mínima relacionada a este procedimento. Já para os indivíduos em estádios avançados (III e IV) utiliza-se, via de regra, a quimiorradioterapia. Eventualmente, dependendo do sítio anatômico a ressecção cirúrgica seguida de radioterapia adjuvante com ou sem quimioterapia (BELCHER et al., 2014) também são empregadas. Para tumores avançados com comprometimento de estruturas adjacentes e linfonodos regionais (estádio IVA, IVB e IVC), geralmente adota-se como conduta terapêutica ou paliativa a quimiorradioterapia (BERNARDO; NUNES, 2010) podendo ser realizado esvaziamento cervical profilático ou terapêutico com a finalidade de evitar recidivas regionais ou ressecar linfonodos já comprometidos ou suspeitos, respectivamente. No entanto, muitos tumores que ocupam o mesmo sítio anatômico e apresentam estágio semelhante, muitas vezes respondem de forma muito variada ao tratamento. Sendo assim, o estudo de biomarcadores que indiquem a progressão tumoral ou possam prever a resposta ao tratamento tem sido amplamente explorado. Desta forma, busca-se um tratamento mais individualizado, evitando o emprego de terapias muito

agressivas para casos que apresentam bom prognóstico, reduzindo assim as complicações decorrentes do tratamento antineoplásico. Por outro lado, procura-se intensificar o tratamento em tumores cujo comportamento biológico mostra-se mais agressivo, aumentando as chances de cura e a sobrevida dos indivíduos.

Seguindo esta tendência, Ang e colaboradores publicaram em 2010 um estudo onde foi proposta a estratificação dos indivíduos com CCE de orofaringe, como parâmetro auxiliar à classificação TNM na decisão terapêutica e na definição do prognóstico. Infecção por HPV e quantidade de cigarros consumidos por ano foram utilizados para agrupar os indivíduos em 3 categorias, de acordo com o risco de morte: baixo, intermediário e alto risco. A relação entre a presença do HPV em amostras tumorais e a resposta ao tratamento em pacientes com CCE de orofaringe tem sido mostrada também em outros estudos (CALEY et al., 2014; ZARAVINOS, 2014). Pacientes com CCE HPV-positivos têm mostrado melhor resposta ao tratamento quando comparados àqueles com CCE HPV-negativos, apresentando melhor prognóstico, maior sobrevida global e sobrevida livre de doença (ANG et al., 2010). Em alguns estudos, a detecção de p16 no tecido tumoral tem sido apontada como um forte fator prognóstico consistentemente associado a diferenças na sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida doença-específica, independentemente do tipo de tratamento instituído (LEWIS, 2012; OGUEJIOFOR et al., 2013).

Sendo assim, conhecer a frequência da infecção por HPV em CCE da cavidade bucal, bem como a resposta ao tratamento em indivíduos com estes tumores pode ter importante valor prognóstico, proporcionando direcionar o tratamento do paciente e melhorar sua qualidade de vida. Portanto, este estudo é importante, uma vez que no estado do Espírito Santo não existem pesquisas relacionadas a este tema, sobretudo ao CCE de cavidade bucal e infecção por HPV.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a frequência de infecção pelo HPV e a expressão de p16 como biomarcador de prognóstico em carcinoma de células escamosas da cavidade bucal.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a frequência de infecção pelo HPV em tecido tumoral de carcinoma de células escamosas da cavidade bucal;
- Avaliar a aplicabilidade da detecção de p16 como indicador da presença do HPV em amostras de carcinoma de células escamosas da cavidade bucal;
- Avaliar a aplicabilidade do p16 como biomarcador de prognóstico, utilizando como parâmetros a análise de sobrevida e resposta ao tratamento em indivíduos com carcinoma de células escamosas da cavidade bucal.

3 METODOLOGIA

3.1 Casuística

O estudo foi realizado a partir de amostras biológicas e dados clínicos de pacientes atendidos nos serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (AFECC) e Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) no período de 2010 a 2014. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde, Vitória - ES (Processo nº 318/2011).

Para a seleção dos casos foram adotados os seguintes critérios de inclusão: 90 pacientes de ambos os gêneros, de todos os grupos étnicos e faixas etárias, com diagnóstico conclusivo de carcinoma de células escamosas da cavidade bucal. Blocos de parafina contendo tecido tumoral e/ou tecido tumoral a fresco disponibilizados pelos pacientes participantes do estudo foram obtidos antes do início do tratamento e submetidos à revisão histopatológica realizada por um patologista. Lâminas e blocos em bom estado de conservação, apresentando tecido tumoral íntegro em mais de 75% da área tecidual total foram incluídos no estudo. Como critérios de exclusão foram considerados: casos com lâminas e blocos defeituosos ou com menos de 75% de tecido tumoral, os quais impossibilitaram a análise; carcinoma de células escamosas de outros sítios anatômicos; recidivas e casos submetidos a tratamentos prévios (cirurgia, quimioterapia e radioterapia).

As variáveis clínicas analisadas foram: idade, gênero, tamanho da lesão primária (T), metástase em linfonodos regionais (N) confirmada microscopicamente e sítio anatômico da lesão primária. História do consumo do álcool e uso do tabaco foram obtidos. Todos os dados foram obtidos por meio de entrevista, consulta médica e busca ativa em prontuários.

3.2 Detecção de HPV

3.2.1 Extração de DNA e Avaliação da Viabilidade da Amostra

90 fragmentos de tecido tumoral foram obtidos por meio de biópsia ou da ressecção cirúrgica do tumor. Os fragmentos foram acondicionados em recipientes esterilizados não excedendo-se 30 minutos após a excisão do paciente e armazenadas em microtubos contendo RNAlater®. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Patologia Molecular da UFES, mantendo-se o tecido tumoral em temperatura de 2 a 8 °C *overnight*. Após este período, o reagente foi drenado e o tecido armazenado à -80 °C.

O DNA genômico de CCE de cavidade bucal congelado a -80 °C foi obtido através de degradação mecânica de um fragmento do tecido, digestão do fragmento degradado mecanicamente com Proteinase K e Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) incubado à 60°C por 2 dias, seguido de extração com clorofórmio e fenol e precipitação com etanol.

O DNA extraído foi submetido à PCR para amplificação de uma sequência correspondente ao gene da β -globina humana, com a finalidade de confirmar a qualidade do DNA. Foram utilizados controles negativos (água ultrapura para PCR) e positivos (amostra de DNA de sangue) da reação. As amostras amplificadas foram então analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo ou Gel Red® e, posteriormente, visualizados em transiluminador ultravioleta para gel de eletroforese e câmera fotográfica Gel Cam EPH-13 Polaroid (Polaroid Corporation, Minnesota, EUA) para verificação da presença de bandas e tamanho dos fragmentos. Somente as amostras com qualidade satisfatória, comprovada através da PCR para o gene da β -globina e visualizadas em gel de agarose foram utilizadas na detecção do HPV.

3.2.2 PCR PGMY09/11

De 90 amostras, 81 amostras que haviam sido amplificadas também com os *primers* MY09/11 e GP5+/6+ foram utilizadas. Amplificação por PCR utilizando o conjunto de *primers* PGMY09/11 (Invitrogen, Life Technologies) foi realizada nas amostras de DNA tumoral com qualidade já confirmada por PCR da β -globina humana. O conjunto de *primers* PGMY09/11 consiste em uma mistura de 18 *primers*, permitindo a amplificação de mais de 30 subtipos de HPV: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 40, 45, 51, 52, 56, 59, 39, 42, 53, 54, 55, 58, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, IS39, CP8304, CP6108, MM4, MM7, MM8. Já é descrito que o conjunto de *primers* PGMY09/11 apresenta maior sensibilidade em relação ao MY09/11, ele foi desenvolvido para melhorar o sistema consenso na literatura (GRAVITT et al., 2000), então foi realizada amplificação com outros *primers* além do par MY09/11 a fim de comparar as técnicas com as amostras disponíveis. Todos os *primers* são adicionados ao mesmo tempo, sendo submetidos a uma única reação de amplificação. As condições reacionais utilizadas foram: uma etapa de ativação da polimerase a 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto; anelamento à 57 °C por 1 minuto; extensão à 72 °C por 1 minuto. Ao final do último ciclo, ocorreu a extensão final a 72 °C por 10 minutos. Os produtos desta reação foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com brometo de etídeo ou Gel Red® e, posteriormente, visualizados em transiluminador ultravioleta para gel de eletroforese e câmera fotográfica Gel Cam EPH-13 Polaroid (Polaroid Corporation, Minnesota, EUA) para confirmação da presença ou não de bandas e tamanho dos fragmentos. Controles negativos (água ultrapura de PCR) e positivos (amostra de DNA conhecida positiva para HPV) da reação foram utilizados.

3.2.3 PCR MY09/11 e nested PCR GP5+/6+

De 90 amostras, 81 amostras que haviam sido amplificadas também com o conjunto de *primers* PGMY09/11 foram utilizadas. Com a finalidade de validar e confirmar os

dados obtidos com a amplificação por *primers* degenerados, utilizou-se os *primers* consenso MY09/11 e GP5+/6+ (Invitrogen, Life Technologies) na realização da nested PCR, para amplificação de uma região conservada do genoma viral referente à L1, responsável pela produção das proteínas principais do capsídeo viral. Inicialmente o DNA tumoral foi amplificado utilizando-se o par de *primers* MY09/11. As condições reacionais utilizadas foram: uma etapa de ativação da polimerase a 94 °C por 7 minutos, seguido de 25 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos; anelamento à 56 °C por 45 segundos; extensão à 72 °C por 45 segundos. Ao final do último ciclo, ocorreu a extensão final a 72 °C por 7 minutos. O produto obtido desta reação foi submetido à amplificação utilizando o par de *primers* GP5+/6+. As condições utilizadas nesta segunda reação foram: uma etapa de ativação da polimerase a 94 °C por 7 minutos, seguido de 15 ciclos de desnaturação a 94 °C por 45 segundos; anelamento à 46 °C por 45 segundos; extensão à 72 °C por 45 segundos. Ao final do último ciclo, ocorreu a extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os produtos finais da nested PCR obtido após amplificação por MY09/11 e GP5+/6+ foram submetidos à eletroforese em gel de acrilamida 8% corados com nitrato de prata e, posteriormente, visualizados em transiluminador para gel de eletroforese e câmera fotográfica Gel Cam EPH-13 Polaroid (Polaroid Corporation, Minnesota, EUA) para verificação da presença ou não de bandas e tamanho dos fragmentos. Controles negativos (água ultrapura de PCR) e positivos (amostra de DNA conhecida positiva para HPV) da reação foram utilizados.

Os *primers* utilizados nas reações de PCR citadas anteriormente, sequências e respectivos fragmentos podem ser visualizados na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados para analisar a qualidade do DNA genômico e na detecção do HPV.

Técnica	Primer	Sequência (5'-3')	Fragmento
PCR Beta-Globina	Beta-Globina F	ACA CAA CTG TGT TCA CTA GC	509 pb
	Beta-Globina R	GAA AAC ATC AAG GGT CCC AT	
PCR PGMY09/11	PGMY11-A:	GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG	450 pb
	PGMY11-B:	GCG CAG GGC CAC AAT AAT GG	
	PGMY11-C:	GCA CAG GGA CAT AAT AAT GG	
	PGMY11-D:	GCC CAG GGC CAC AAC AAT GG	
	PGMY11-E:	GCT CAG GGT TTA AAC AAT GG	
	PGMY09-F:	CGT CCC AAA GGA AAC TGA TC	
	PGMY09-G:	CGA CCT AAA GGA AAC TGA TC	
	PGMY09-H:	CGT CCA AAA GGA AAC TGA TC	
	PGMY09-I:	G CCA AGG GGA AAC TGA TC	
	PGMY09-J:	CGT CCC AAA GGA TAC TGA TC	
	PGMY09-K:	CGT CCA AGG GGA TAC TGA TC	
	PGMY09-L:	CGA CCT AAA GGG AAT TGA TC	
	PGMY09-M:	CGA CCT AGT GGA AAT TGA TC	
	PGMY09-N:	CGA CCA AGG GGA TAT TGA TC	
	PGMY09-P:	G CCC AAC GGA AAC TGA TC	
	PGMY09-Q:	CGA CCC AAG GGA AAC TGG TC	
PGMY09-R:	CGT CCT AAA GGA AAC TGG TC		
	HMB01:	GCG ACC CAA TGC AAA TTG GT	
PCR MY09/11	MY11	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG	450 pb
	MY09	CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC	
<i>Nested</i> PCR GP5+/6+	GP5+	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	150 pb
	GP6+	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATTC	

3.2.4 Sequenciamento do HPV

Para validar os resultados positivos obtidos nas amplificações realizadas, os produtos de PCR das amostras positivas para HPV foram purificados utilizando ExoSAP-IT

PCR Clean-up Kit (GE Healthcare Life Sciences, Upsala, Sweden) e posteriormente sequenciados através de sequenciamento automático, utilizando BigDyer Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As amostras foram submetidas à eletroforese capilar no ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Todo o processo de sequenciamento foi realizado na Universidade de São Paulo, com a finalidade de obter-se a sequência do DNA viral e assim conhecer o tipo de HPV envolvido na infecção.

3.2.5 Análise da expressão de p16

Dos 90 pacientes selecionados para o estudo, 31 pacientes com amostras de tecido tumoral incluído em parafina disponíveis para o estudo foram utilizadas para a análise de expressão de p16. Esta análise foi realizada por imunohistoquímica (IHC). Amostras de tecido tumoral fixado em formalina a 10% e posteriormente incluídos em parafina foram seccionadas com espessura de 3 µm. A secção contendo tecido tumoral foi colocada em lâmina previamente silanizada. Os espécimes foram desparafinizados com xilol e re-hidratados em concentrações graduais de álcool e posteriormente lavadas em água destilada. Para recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em tampão citrato pH 6,0 sob pressão à temperatura de 121°C por 3 minutos (Pressure Cooker, Aptum Biologics - UK), e em seguida resfriadas à temperatura ambiente. Após lavagem em água deionizada, procedeu-se à neutralização da peroxidase endógena, incubando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos. A seguir os espécimes foram lavados com tampão Tris-SDS (TBS) por 5 minutos e seguiu-se com o bloqueio de proteínas, por 5 minutos. Após lavagem com TBS por 5 minutos, as lâminas foram então incubadas a 4°C *overnight* com o anticorpo primário monoclonal anti-p16 humano (clone E6H4, CINtec p16INK4a Histology Kit, Ventana Medical Systems, USA) diluição 1:5.

Após período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com TBS, incubadas com o anticorpo secundário (Post Primary, Novolink™ – Novocastra™) por 30 minutos e lavadas novamente por 5 minutos. Aplicou-se em

seguida o polímero (Novolink™ Polymer - Novocastra™) e as lâminas foram incubadas novamente por 30 minutos, lavando-se com TBS por 5 minutos após esta etapa. Aplicação de reagente cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina) foi realizada por 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris (EasyPath®), e recobertas com lamínula e montadas utilizando-se meio de montagem (Entelan® - Merck Millipore).

Controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por PBS-BSA 1% e soro não imune de camundongo (X501-1; DAKO). Amostra de carcinoma de células escamosas de orofaringe conhecidamente positiva para expressão de p16 foi utilizada como controle positivo.

A expressão de p16 foi classificada como positiva na presença de coloração forte e difusa, tanto nuclear quanto citoplasmática. Qualquer outro padrão de coloração foi classificado como negativo. Todas as amostras foram classificadas independentemente por dois patologistas e em caso de discordância, as lâminas foram revisadas e um consenso para a classificação foi obtido.

O percentual de células marcadas foi determinado utilizando-se o H-Score (JORDAN et al., 2012). O H-score consiste em uma análise semiquantitativa obtida pelo produto da intensidade de marcação (avaliadas em uma escala de 0 a 3) e a porcentagem de células tumorais coradas em cada nível de intensidade (0 a 100%). Portanto, os valores para o H-Score variam de 0 a 300.

Jordan e colaboradores utilizaram a curva ROC para determinar sensibilidade e especificidade, chegando à conclusão de que, para a intensidade de marcação o escore 2 representou o de maior sensibilidade, e para a porcentagem de células marcadas, 35% foi a porcentagem mais específica para detecção de HPV de alto risco. Então foi escolhido o ponto de corte de 60 no H-Score, que representou uma sensibilidade de 91,6% e especificidade de 90,4% para a detecção, comparando com o padrão ouro para a detecção do HPV, que seria a expressão de E6 e E7. Portanto, este ponto de corte também foi utilizado em nosso estudo.

Cálculo utilizado para o H-Score:

$$\text{H-Score} = [1 \times (\% \text{ células intensidade 1}) + 2 \times (\% \text{ células intensidade 2}) + 3 \times (\% \text{ células intensidade 3})]$$

Onde:

0 = ausência de marcação

1 = marcação de fraca intensidade

2 = marcação de intensidade moderada

3 = marcação de intensidade forte

3.2.6 Interpretação dos resultados dos testes para detecção de HPV

Para a nested PCR MY09/11 e GP5+/6+, a amostra é positiva para HPV na presença de banda de 150pb, enquanto que na multiplex PCR utilizando PGMY09/11, a amostra é positiva na presença de banda de 450pb. A ausência de bandas ou o aparecimento de bandas correspondentes a outros pesos moleculares foram considerados resultados negativos.

Uma classificação binária (positivo x negativo) foi utilizada para avaliar a expressão de p16 e as reações de amplificação para o HPV. Para a expressão imunohistoquímica de p16, todos os resultados obtidos no H-Score ≥ 60 foram considerados positivos, enquanto os resultados <60 foram considerados negativos.

3.3 Estudo de Sobrevida

Dos 90 pacientes selecionados para o estudo, 58 apresentaram dados de acompanhamento, sendo estes utilizados para o estudo de sobrevida. Após o diagnóstico conclusivo de CCE de cavidade bucal, os pacientes foram encaminhados

ao tratamento, de acordo com a decisão da equipe médica, considerando o estadiamento do tumor e o sítio anatômico. Os pacientes foram então agrupados de acordo com a modalidade de tratamento instituído: cirurgia exclusiva; cirurgia com radioterapia adjuvante e quimiorradioterapia.

Após esta etapa os pacientes foram acompanhados periodicamente, com o primeiro seguimento (F1) realizado em um período que variou de 6 a 18 meses após a consulta onde foi realizado o diagnóstico conclusivo. O segundo seguimento (F2) foi realizado 06 meses após o primeiro seguimento (F1); e o terceiro seguimento (F3) ocorreu após 30 meses da data do diagnóstico. Em cada consulta de seguimento foi realizada uma avaliação clínica da progressão tumoral, sendo consideradas as informações obtidas durante a avaliação realizada pela equipe médica, considerando as variáveis: remissão, recorrência do tumor, recidiva regional ou à distância, ou óbito. Estes dados foram utilizados para avaliar a resposta ao tratamento instituído e para realizar as comparações com os biomarcadores estudados.

3.4 Análise estatística

Foram inseridas em banco de dados todas as informações clínico-patológicas, bem como os resultados das análises laboratoriais realizadas na população estudada. A análise estatística foi feita utilizando-se o software SPSS (Statistic Package for Social Sciences) versão 20.0.

A associação entre as variáveis clínico-patológicas foi realizada utilizando o teste exato de Fisher ou o teste do Qui-quadrado, com valor de $p < 0,05$ considerado significativo.

O estudo da sobrevida foi realizado utilizando-se a análise de Kaplan-Meier e o teste de Log-Rank para comparação das curvas geradas. Para análise da sobrevida doença-específica (SDE) foram consideradas as datas do óbito versus a duração da sobrevida total, considerando-se que todos os pacientes apresentaram como causa

de óbito, o câncer. Para avaliação da sobrevida livre de doença (SLD) foram consideradas a data da recorrência versus a duração do acompanhamento livre de doença.

Foram considerados “não censurados” para os cálculos da sobrevida doença-específica e livre de doença todos os casos em que ocorreu o evento de interesse (óbito, para a sobrevida doença-específica e recorrência, para a sobrevida livre de doença). Os casos em que os eventos não ocorreram até a data da última informação objetiva do acompanhamento foram classificados como “censurados”. As variáveis significativas pelo teste do Log-Rank usado na Análise de Kaplan-Meier foram inseridas no Modelo de Regressão de Cox para determinar a contribuição individual das co-variáveis em relação à sobrevida. Foi utilizado o método stepwise backward Wald, o que permitiu detectar as variáveis mais associadas à sobrevida.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 90 indivíduos atenderam aos critérios de inclusão pré-estabelecidos. Destes, foi possível realizar todas as PCR propostas em 81 pacientes. A idade média da população analisada no estudo foi de 57,92 anos (IC = 30 – 93), com predomínio do gênero masculino (76,5%).

As principais características da população analisada, como história do uso do tabaco e consumo do álcool, bem como aspectos clínicos estão resumidos na tabela 2. Ainda na tabela 2 está representado o resultado da análise de HPV, cujo *status* foi descrito como positivo e negativo (n = 81), tendo sido considerados HPV positivo os casos nos quais foi detectado DNA viral na análise molecular.

No total de casos analisados, foram detectados 3 indivíduos com CCE HPV positivos (3/81), sendo a frequência de infecção de 3,7%. Dentre os casos HPV positivos, 2 são do gênero masculino, tabagistas e etilistas crônicos. Todos os casos HPV positivos (3/81) apresentaram estágio avançado da doença (III-IV), tamanho de tumor (T3/T4) e metástase em linfonodos regionais (N+), conforme pode ser observado em detalhe na tabela 2.

Tabela 2 Características clínicas da população analisada e status da infecção por HPV (n=81).

Variáveis	HPV+ n (%)	HPV- n (%)	Valor de p
Gênero			
Masculino	2 (2,47)	60 (74,07)	0,556
Feminino	1 (1,24)	18 (22,22)	
Consumo de álcool e tabaco			
Sim	2 (2,47)	33 (40,74)	1,0
Não	1 (1,24)	13 (16,05)	
Tumor primário (T)			
T1/T2	0 (0)	31 (38,27)	0,275
T3/T4	3 (3,70)	45 (55,56)	
Não informado		2 (2,47)	
Linfonodos regionais (N)			
N0	0 (0)	43 (53,09)	0,09
N+	3 (3,70)	33 (40,74)	
Não informado		2 (2,47)	
Estádio			
I/II	0 (0)	23 (28,39)	0,553
III/IV	3 (3,70)	54 (66,67)	
Não informado		1 (1,24)	

Legenda: N0 = sem metástase em linfonodos regionais

N+= Com metástase em linfonodos regionais

Teste Qui-quadrado. $p < 0,05$ considerado significativo.

A patogênese do CCE da cavidade bucal envolve reconhecidos carcinógenos como o tabaco e seu efeito sinérgico com o álcool. Nos últimos anos, outros fatores, incluindo vírus, têm sido implicados na carcinogênese oral, principalmente em conjunto com os carcinógenos presentes no tabaco. Vários estudos têm mostrado que o CCE de cabeça e pescoço, especialmente aqueles localizados em orofaringe, estão altamente relacionados a HPV de alto risco oncogênico (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013; RIVERO; NUNES, 2006).

Dados de estudos caso-controle e meta-análise indicaram que o HPV é um fator de risco independente para carcinoma de células escamosas oral e orofaríngeo (DAYYANI et al., 2010; FAKHRY; PSYRRI; CHATURVEDHI, 2014). Carcinoma de células escamosas de orofaringe, particularmente aqueles envolvendo a tonsila palatina, têm mostrado forte associação com HPV, com alguns estudos mostrando

incidência desse vírus em até 60% dos tumores. Revisão sistemática publicada em 2010 por Dayyani e colaboradores mostrou que a prevalência global de HPV é de 25,9% em espécimes obtidos de 5.046 pacientes com CCE de cabeça e pescoço analisados em 60 estudos isolados. Estes dados também mostraram que a incidência de HPV foi significativamente mais elevada (36%) entre pacientes com câncer de orofaringe quando comparados com câncer bucal (23,5%) ou laríngeo (24%). Contudo, ainda não está esclarecido se a alta frequência de HPV em CCE de orofaringe consiste em HPV biologicamente relevantes, embora há uma tendência, confirmada pela publicação de vários relatos, confirmando a participação do HPV na carcinogênese do CCE da orofaringe (WEINBERGER et al., 2006).

A participação do HPV na patogênese do CCE de cavidade bucal (tumores dos 2/3 anteriores da língua, assoalho bucal, rebordo alveolar, gengiva, mucosa bucal e labial e palato duro) também tem sido amplamente pesquisada. No entanto, até o momento, não tendo sido estabelecida uma correlação precisa, sobretudo relacionada à ampla variação na incidência de infecção por HPV de alto risco oncogênico nestes tumores (LOPES et al., 2011; MARTÍN-HERNÁN et al., 2013). Sendo assim, apesar de diversos estudos publicados apontarem a participação do HPV na carcinogênese dos tumores da cavidade bucal, ainda há muitas divergências, sobretudo envolvendo grande variação na frequência de infecção pelo HPV nestes tumores.

Estudo publicado por Lopes e colaboradores (2011) mostrou incidência extremamente baixa, inferior a 2%, de infecção por HPV em CCE da cavidade bucal. Estudos realizados no Brasil, apesar de poucos, também têm mostrado baixa frequência de infecção por HPV em CCE da cavidade bucal (RIVERO; NUNES, 2006). Recentemente, López e colaboradores (2014) mostraram uma incidência de 6,6% de HPV (8/121) em amostras de CCE da cavidade bucal. Esta baixa frequência de infecção também foi observada em nosso estudo (3,7%).

Resultados discrepantes encontrados na literatura podem ser explicados pelo emprego de diferentes metodologias e técnicas na detecção de HPV, assim como também pode ser explicado por diferenças étnicas e geográficas que certamente influenciam o processo de carcinogênese.

Neste estudo particularmente, observamos também a sobreposição de fatores possivelmente relacionados à carcinogênese. Assim, 2 dos 3 indivíduos com tumores HPV positivos também eram etilistas e tabagistas crônicos. Além disso, nossos resultados mostraram associação significativa entre a presença de metástase em linfonodos regionais (N) e o uso do tabaco, como pode ser observado na tabela 3.

Tabela 3. Associação entre características clínicas tumorais, tamanho do tumor e metástase em linfonodos regionais, fatores de risco (tabagismo e etilismo) e infecção por HPV.

	Tabagismo		p	Etilismo		p	HPV status		p
	Não N(%)	Sim N(%)		Não N(%)	Sim N(%)		Neg N(%)	Pos N(%)	
T									
T1/2	18 (48.6)	15 (31.9)		15 (40.5)	18 (38.3)		33 (40.2)	0 (0)	
T3/4	19 (51.4)	32 (68.1)	0,119	22 (59.5)	29 (61.7)	0,834	49 (59.8)	3 (100)	0,279 ^a
N									
N0	24 (64.9)	20 (42.6)		20 (54.1)	24 (51.1)		45 (54.9)	0 (0)	
N+	13 (35.1)	27 (57.4)	0,042*	17 (45.9)	23 (48.9)	0,785	37 (45.1)	3 (100)	0,100 ^a

Teste Qui-quadrado.*p < 0,05 considerado significativo

^aTeste Exato de Fisher

Com a finalidade de garantir a efetividade das análises realizadas em nosso estudo com a amplificação do DNA do HPV, realizamos uma sequência de técnicas moleculares, as quais são reconhecidas e amplamente utilizadas para detecção de HPV de alto risco oncogênico em estudos utilizando amostras de CCE da cavidade bucal. A sequência das técnicas realizadas bem como os resultados detalhados foram organizados em forma de algoritmo e estão representados na figura 4.

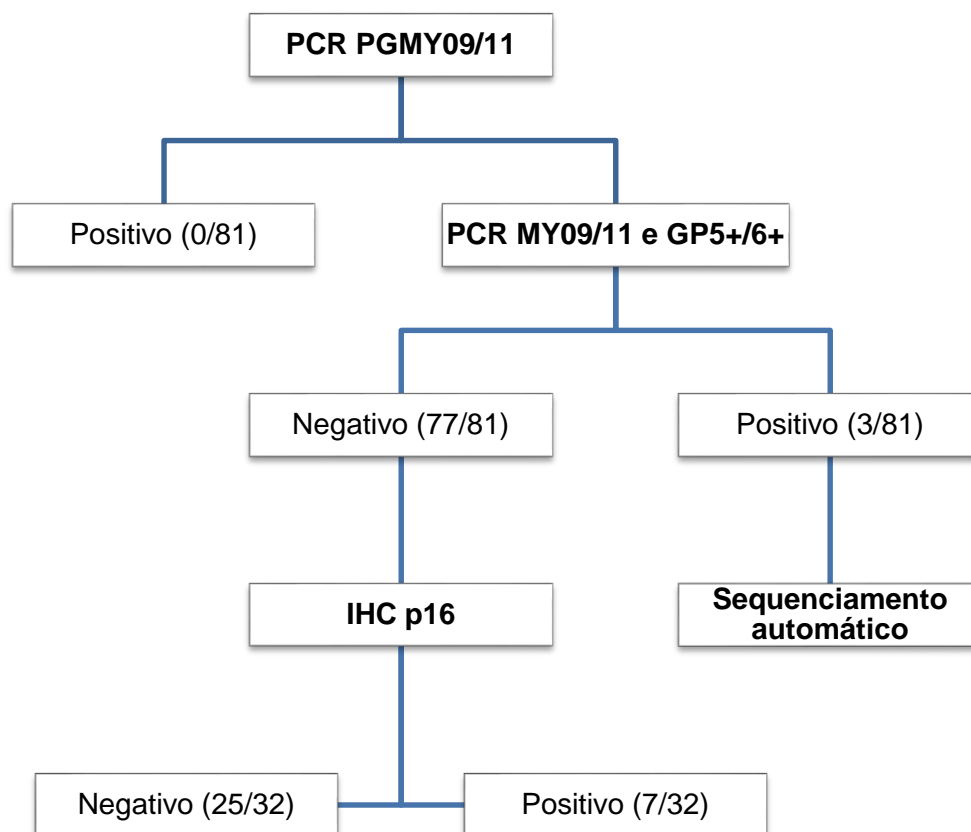


Figura 4. Algoritmo representativo das etapas de detecção do HPV em amostras de CCE da cavidade bucal contendo o número de amostras analisadas e o resultado parcial simplificado.

Após extração do DNA do tecido tumoral, a qualidade do DNA foi verificada utilizando amplificação de um gene constitutivo, gene da β -globina humana. Amostras que mostraram DNA íntegro com uma banda de 509pb foram então submetidas às análises moleculares subsequentes (Figura 5).

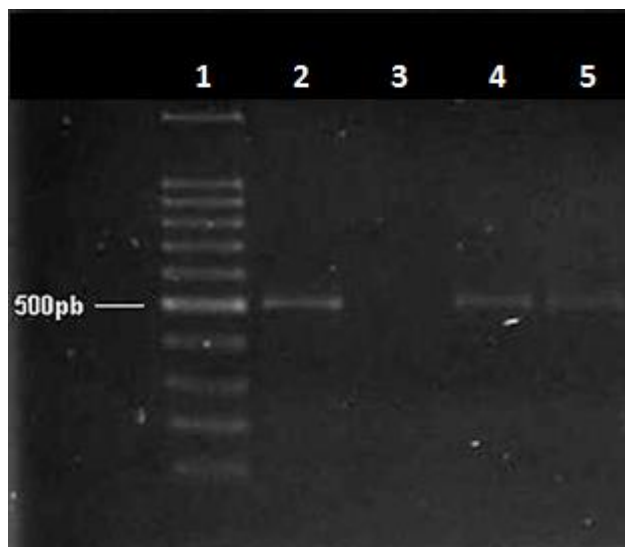


Figura 5. Produtos da amplificação por PCR do gene da β -globina humana. Fotografia da eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídio. Marcador de peso molecular (1); Controle positivo (2); Controle negativo (3); amostras com qualidade satisfatória (4 e 5)

A detecção do HPV foi inicialmente realizada à partir da amplificação da região do gene L1 do genoma viral, utilizando o conjunto de *primers* PGMY09/11. Nesta etapa, não foi detectado DNA de HPV nas amostras analisadas (0/81). O produto esperado desta reação deveria apresentar um fragmento de 450pb para considerar a amostra contendo o DNA viral integrado ao genoma da célula, conforme ilustrado na Figura 6, na coluna correspondente ao controle positivo.

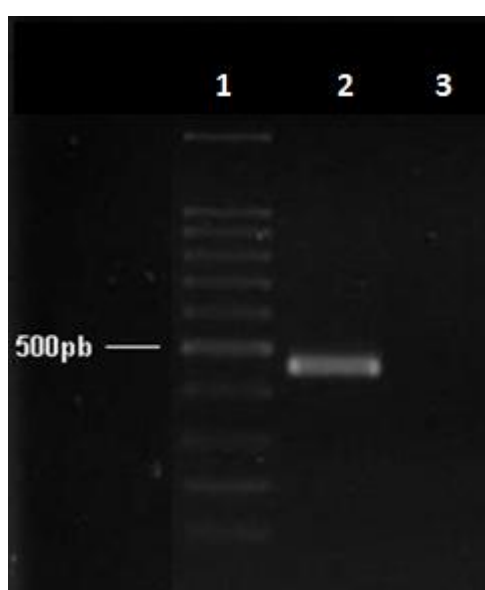


Figura 6. Detecção de HPV por multiplex PCR utilizando o conjunto de primers PGMY09/11. Fotografia da eletroforese em gel de agarose a 1,5% corado com brometo de etídeo. Marcador de peso molecular (1); Controle positivo (2); Controle negativo (3). n=81

Em seguida, as mesmas amostras foram submetidas à nested PCR, iniciada com os *primers* MY09/11. O produto desta reação foi amplificado com os *primers* GP5+/6+(Figura 7). Após análise do produto final desta reação, 3 amostras (3/81) apresentaram bandas com fragmento de 150pb.

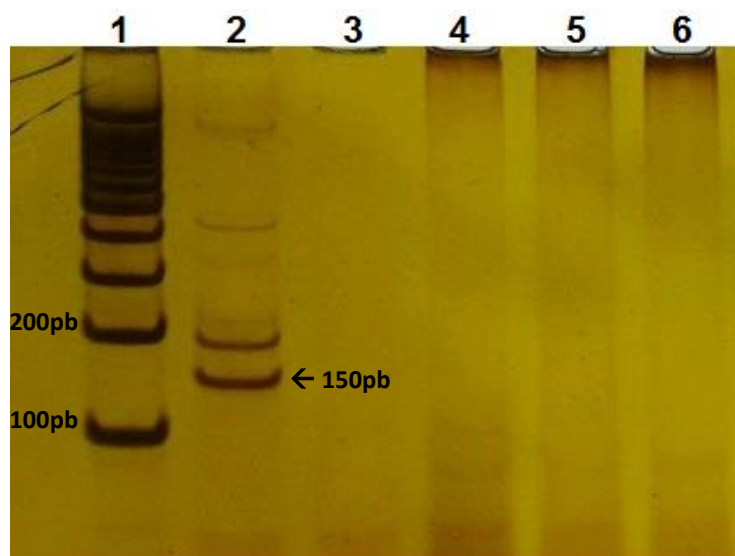


Figura 7. Detecção de HPV por nested PCR utilizando os *primers* MY09/11 e GP5+/6+. Fotografia da eletroforese em gel de poliacrilamida a 8% mostrando o produto final da nested PCR. Marcador de peso molecular (1); Controle positivo (2); Controle negativo (3); Amostras HPV negativas (4, 5 e 6). n=81

A ausência de amplificação por PCR do DNA de HPV nos casos estudados de CCE da cavidade bucal, tanto no nosso estudo quanto em outros (LOPES et al., 2011; LÓPEZ et al., 2014; RIVERO; NUNES, 2006), sugere que este vírus não tenha função determinante na carcinogênese dos tumores da cavidade bucal.

As amostras que apresentaram resultado positivo para a nested PCR utilizando os *primers* MY09/11 e GP5+/6+ foram submetidos a sequenciamento automático. Em nosso estudo, HPV-16 foi identificado em todas as amostras (3/3) onde o genoma do HPV foi detectado. Assim, nossos resultados confirmam os achados de estudos anteriores os quais têm mostrado que, dentre os genótipos de HPV de alto risco oncogênico, o HPV-16 é o mais prevalente em tumores de cabeça e pescoço, representando 87% dos casos de CCE de orofaringe, 68% da cavidade bucal e 69% dos tumores da laringe(DAYYANI et al., 2010; KREIMER et al., 2005; TERMINE et al., 2008).

Um total de 32 casos incluídos no estudo apresentaram disponibilidade de tecido tumoral incluídos em parafina, nos quais foi realizada a análise de expressão de p16 utilizando imunohistoquímica (Figura 8).

Em nosso estudo foram observados 7 casos de tumores apresentando aumento da expressão de p16. Todos os casos p16 positivos foram negativos para o DNA viral (p16 positivos/HPV negativos). Em contrapartida, houve predomínio de tumores p16 negativos/HPV negativos (n =25). Uma limitação do estudo foi a impossibilidade de se relacionar a expressão de p16 com a presença do HPV, uma vez que os casos p16 positivos eram HPV negativos e não havia amostras disponíveis de tumor incluído em parafina para que os tumores HPV positivos fossem submetidos à imunohistoquímica.

Duncan e colaboradores (2013) mostraram que a análise da expressão de p16 por IHC é um método viável, pois além de ser uma técnica simples, os resultados da expressão estariam relacionados à infecção por HPV de alto risco oncogênico. Esta conclusão foi baseada no fato de que em seu estudo todos os casos HPV positivos apresentaram alta expressão de p16, comprovando a relação entre as duas técnicas.

Já Lingen e colaboradores(2013) mostraram um número de amostras com expressão de p16 maior em comparação à quantidade de amostras HPV positivas, assim como o observado em nosso estudo. Então, podemos inferir comparando estes resultados que, devido à baixa frequência da infecção por HPV em cavidade bucal, e também devido à baixa carga viral encontrada nos tumores HPV positivos neste sítio anatômico (LOPES et al., 2011), a expressão de p16 analisada por imunohistoquímica não apresenta uma correlação absoluta com a detecção molecular disponível atualmente, e portanto, pode não ser um marcador útil para substituir a detecção de HPV por métodos moleculares em cavidade bucal. Dessa forma, a expressão de p16 por imunohistoquímica deveria ser utilizada como *screening* para detecção de casos positivos, não dispensando, para o CCE da cavidade bucal, a detecção viral por técnicas moleculares.

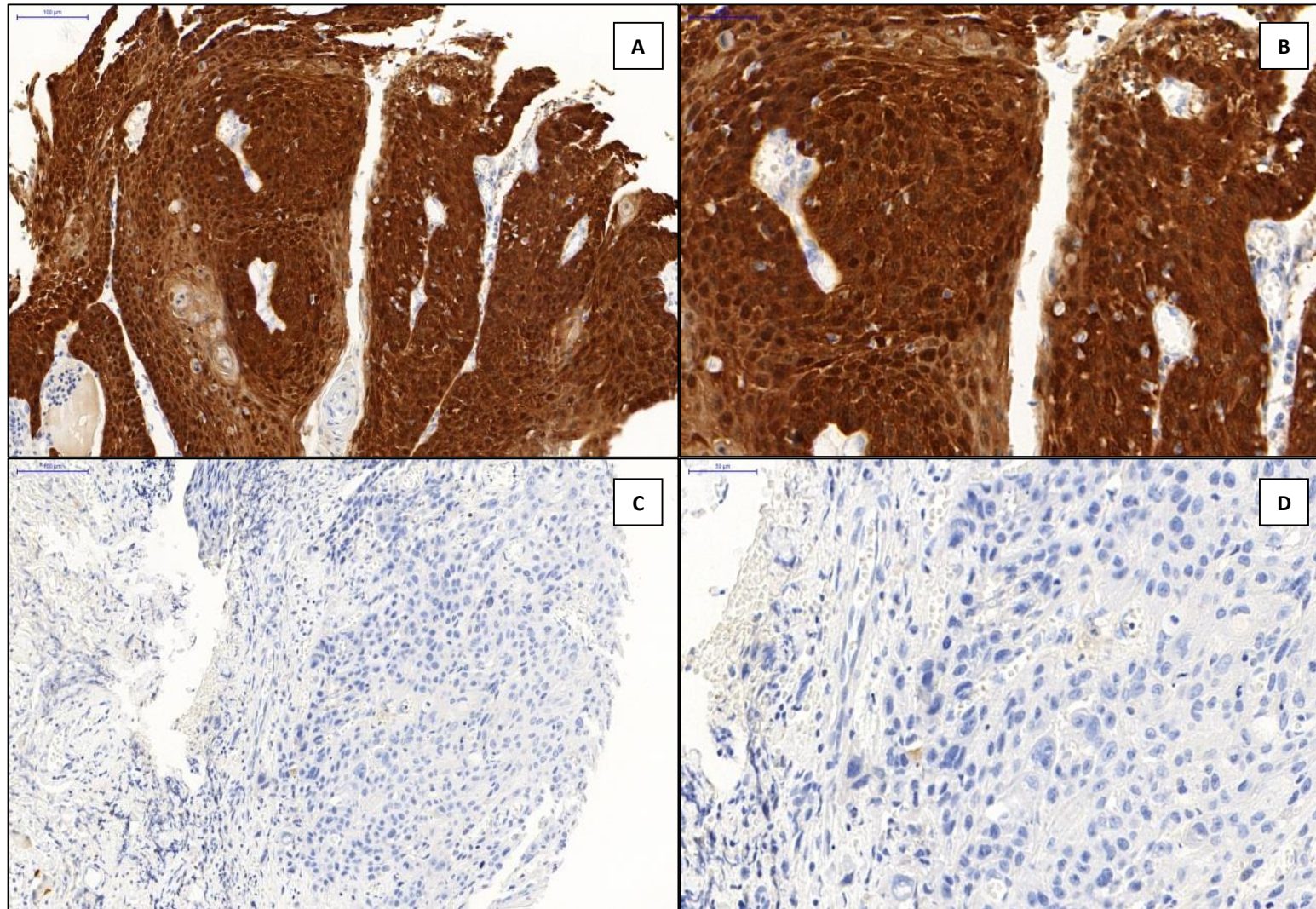


Figura 8. Fotomicrografia representativa da expressão de p16 (imunohistoquímica). **(A, B):** CCE da cavidade bucal com intensa expressão de p16. **(C, D):** CCE da cavidade bucal com ausência de expressão de p16. Aumento x200 **(A e C)**; Aumento x400 **(B e D)**.

Há ainda a possibilidade de a expressão aumentada do p16 estar envolvida com outros fatores de risco não relacionados ao HPV. Um mecanismo alternativo seria a ocorrência de distúrbios na via do retinoblastoma, como a inativação mutacional da pRB (MARUR et al., 2010). Portanto, o custo benefício da utilização da IHC para análise da expressão de p16 em substituição à detecção do HPV em cavidade bucal deve ser mais amplamente avaliada em estudos futuros.

Para avaliar o prognóstico dos pacientes com CCE da cavidade bucal, foram utilizados dados da resposta ao tratamento e sobrevida. Assim, os pacientes foram distribuídos em 3 grupos, de acordo com a modalidade de tratamento ao qual foram submetidos, como segue: cirurgia, cirurgia associada à radioterapia adjuvante com ou sem quimioterapia e quimiorradioterapia (pacientes sem possibilidades de se realizar cirurgia). Como a escolha da modalidade terapêutica atualmente é estabelecida considerando o sítio anatômico do tumor e o estágio clínico, estes dados foram agrupados e estão sumarizados na tabela 4.

Durante o desenvolvimento deste estudo os pacientes foram acompanhados e avaliados pela equipe médica. Dados sobre a resposta ao tratamento foram obtidos durante as consultas médicas e nos prontuários, sendo distribuídos em 3 categorias: remissão, recorrência e óbito. No total 59 pacientes foram acompanhados, sendo o tempo médio de seguimento de 25,5 meses (IC = 20 -30). Na tabela 4 foi observada associação significativa entre estágio clínico do tumor e modalidade terapêutica instituída ($p < 0,0001$) bem como com a resposta ao tratamento ($p < 0,0001$).

Tabela 4. Relação entre estágio, modalidade terapêutica instituída e resposta ao tratamento.

Estádio	Modalidade de Tratamento (n=59)			p-valor	Resposta ao Tratamento (n=55)			p-valor
	Cirurgia	Cirurgia + radioterapia adjuvante	Quimiorradioterapia		Remissão	Recorrência	Óbito	
I/II	10	9	1	<0,0001*	12	4	2	<0,0001*
III/IV	2	11	26		7	2	28	

Teste de Qui-quadrado. * $p < 0,05$ considerado significativo.

As análises de sobrevida incluíram sobrevida doença-específica (SDE) e sobrevida livre de doença (SLD). Ao estimar as taxas de sobrevida doença-específica utilizando o método de Kaplan-Meier, os pacientes que apresentaram maior sobrevida foram aqueles que apresentaram tumores em estágios iniciais, com tamanho tumoral menor que 2cm (T1), sem metástase linfonodal (N0) e com estágio inicial (Estádio I), os quais foram submetidos exclusivamente ao tratamento cirúrgico. As demais variáveis analisadas: gênero, idade, tabagismo, etilismo, sítio anatômico do tumor, recorrência e expressão de p16, não influenciaram nas curvas de sobrevida doença-específica, conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5. Análise da sobrevida doença-específica e sua relação com as variáveis clínico-epidemiológicas e expressão de p16 (n = 58).

Variável	Categoria	Sobrevida doença-específica		
		Sobrevida média (em meses)	IC (95%)	p Log-Rank
Gênero	Feminino	25,23	19,34 - 31,13	0,764
	Masculino	26,76	15,29 - 38,23	
Idade	Até 59 anos	21,38	15,17 - 27,59	0,15
	≥ 60 anos	29,89	21,09 - 38,69	
Tabagismo	Tabagista	25,8	18,77 - 32,83	0,237
	Não tabagista	23,01	16,99 - 29,03	
Etilismo	Etilista	21,39	15,57 - 27,21	0,769
	Não etilista	25,79	18,76 - 32,83	
Sítio anatômico	Língua	24,39	18,98 - 29,80	0,847
	Assoalho bucal	25,16	15,41 - 34,90	
	Outros sítios	20,1	10,76 - 29,44	
Tamanho do tumor (T)	T1	39,2	39,20 - 39,20	0,001*
	T2	27,14	20,54 - 33,74	
	T3	24,7	18,70 - 30,71	
	T4	15,65	9,54 - 21,76	
Metástase em linfonodos regionais (N)	N0	30,42	23,11 - 37,73	0,006*
	N+	18,32	11,12 - 25,52	
Estádio	I	39,2	39,20 - 39,20	0,001*
	II	30,5	24,83 - 36,18	
	III	22,89	16,68 - 29,09	
	IV	16,91	10,48 - 23,35	
Modalidade terapêutica	Cirurgia	33,07	27,42 - 38,73	<0,0001*
	Cirurgia + radioterapia adjuvante	31,03	23,22 - 38,83	
	Quimiorradioterapia	16,46	10,14 - 22,78	
Recorrência	Não	24,51	18,37 - 30,65	0,062
	Sim	35,87	31,81 - 39,92	
Expressão de p16	Negativo	22,9	17,88 - 27,91	0,704
	Positivo	25,28	14,78 - 35,79	

Análise de Kaplan-Meier. *p<0,05 considerado significativo.

Resultados de sobrevida doença-específica relacionadas as variáveis observadas neste estudo são similares a resultados já publicados (BELCHER et al., 2014; LÓPEZ et al., 2014). Uma vez que o tipo de tratamento é definido de acordo com o estágio clínico, pressupõe-se que indivíduos com estádios iniciais apresentem melhor resposta ao tratamento e portanto maior sobrevida. Além disso, tumores com menores dimensões tendem a ser tratados com cirurgia exclusiva, sendo maior a possibilidade

de ressecção completa do tumor, enquanto tumores com maiores dimensões são tratados, em sua maioria, com quimiorradioterapia, apresentando maior risco de recidiva, bem como maior número de complicações decorrentes do tratamento antineoplásico, o que pode interferir diretamente na curva de sobrevida (Figura 9).

Conhecendo a frequência da infecção por HPV, algumas condutas poderiam ser modificadas, como: adoção de terapias menos agressivas; redução de toxicidade e reações adversas à terapia; redução de custos do tratamento e melhoria da qualidade de vida do paciente com CCE da cavidade bucal. No entanto, devido ao reduzido número de tumores HPV positivos na nossa amostra, não foi possível traçar a correlação entre o *status* da infecção por HPV e as variáveis utilizadas para analisar prognóstico. Portanto, HPV não mostrou-se um indicador eficiente de prognóstico em CCE da cavidade bucal.

Em CCE de orofaringe, o *status* da infecção pelo HPV tem sido considerado um importante indicador de prognóstico. Possivelmente, a melhor resposta ao tratamento em pacientes com CCE HPV-positivos deve-se à maior sensibilidade do tumor à quimiorradioterapia, em comparação com CCE HPV negativos. Esta sensibilidade é aumentada devido aos danos secundários à incorporação das oncoproteínas E6 e E7 na célula tumoral (MARUR et al., 2010). A presença de TP53 funcional nos tumores HPV positivos, o que não ocorre no CCE associado ao tabaco, pode explicar também a melhor resposta ao tratamento, já que este gene pode induzir vias apoptóticas, tornando o tumor mais sensível à apoptose induzida pela radiação (RAGIN; TAIOLI, 2007).

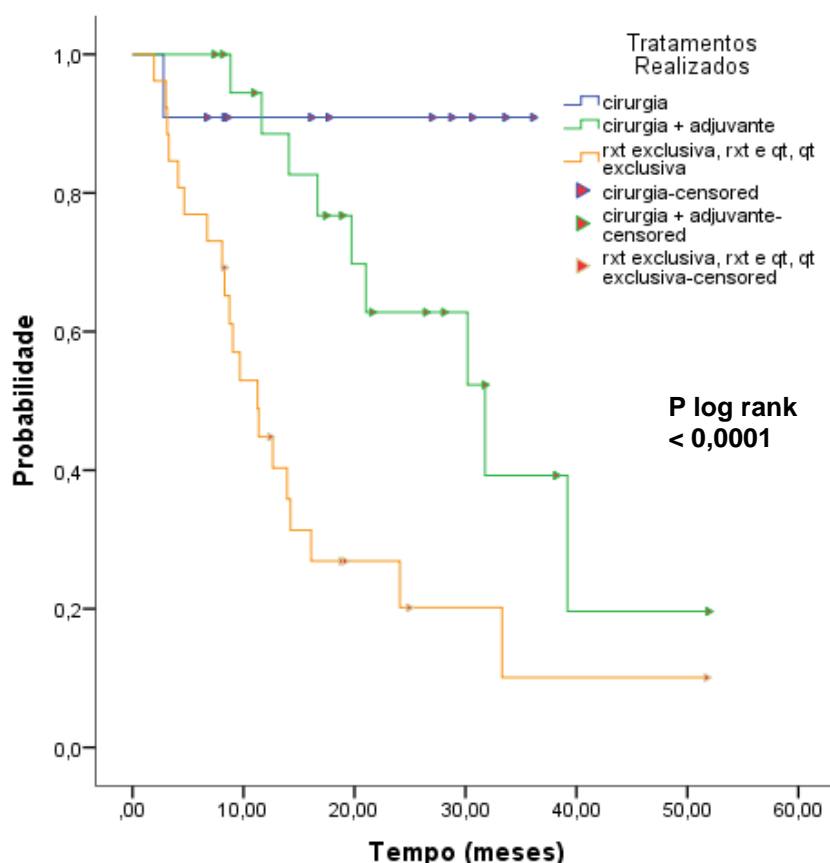


Figura 9. Sobrevida Doença-Específica segundo modalidade terapêutica instituída (Cirurgia; Cirurgia + radioterapia adjuvante; Quimiorradioterapia). Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. As setas na curva representam dados censurados. Rxt: Radioterapia; qt: quimioterapia.

Adicionalmente, alguns estudos têm mostrado que a ausência de metástase linfonodal é um indicador de bom prognóstico uma vez que a presença destas metástases pode reduzir em até 50% a sobrevida de pacientes com CCE da cavidade bucal (KÖHLER; KOWALSKI, 2012; MONTORO et al., 2008).

Em nosso estudo, no entanto, o Modelo de Cox, utilizado para verificar a influência das co-variáveis entre si, revelou que somente estágio e modalidade terapêutica adotada poderiam ser considerados fatores prognósticos independentes para pior sobrevida doença-específica, porém não foi observada diferença significativa entre estas variáveis (Tabela 6).

Tabela 6. Modelo de Cox para Sobrevida Doença-Específica

Co-Variáveis	Risco Relativo	Intervalo de Confiança	p
Estadiamento	1,665	0,915 - 3,031	0,083
Modalidade terapêutica	2,048	0,910 - 4,611	0,095

Modelo de regressão de Cox. * $p < 0,05$ considerado significativo.

Para análise da sobrevida livre de doença foi considerado o intervalo entre a data do diagnóstico e a data da primeira recorrência. A média (em meses) da sobrevida livre de doença foi de 30,05 (IC = 25,63- 34,48). A curva de sobrevida livre de doença está representada na figura 10.

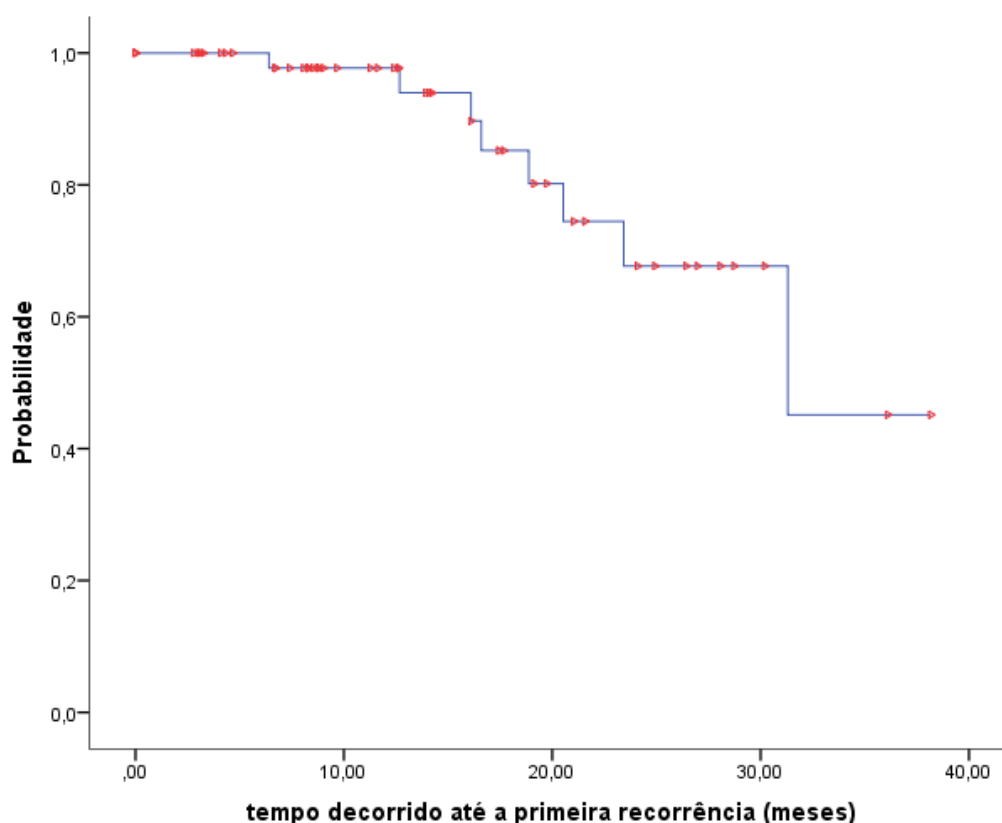


Figura 10. Sobrevida Livre de Doença. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. As setas na curva representam dados censurados.

A expressão de p16 foi correlacionada com as variáveis de prognóstico e as curvas de sobrevida doença-específica e sobrevida livre de doença e está representada na figura 11.

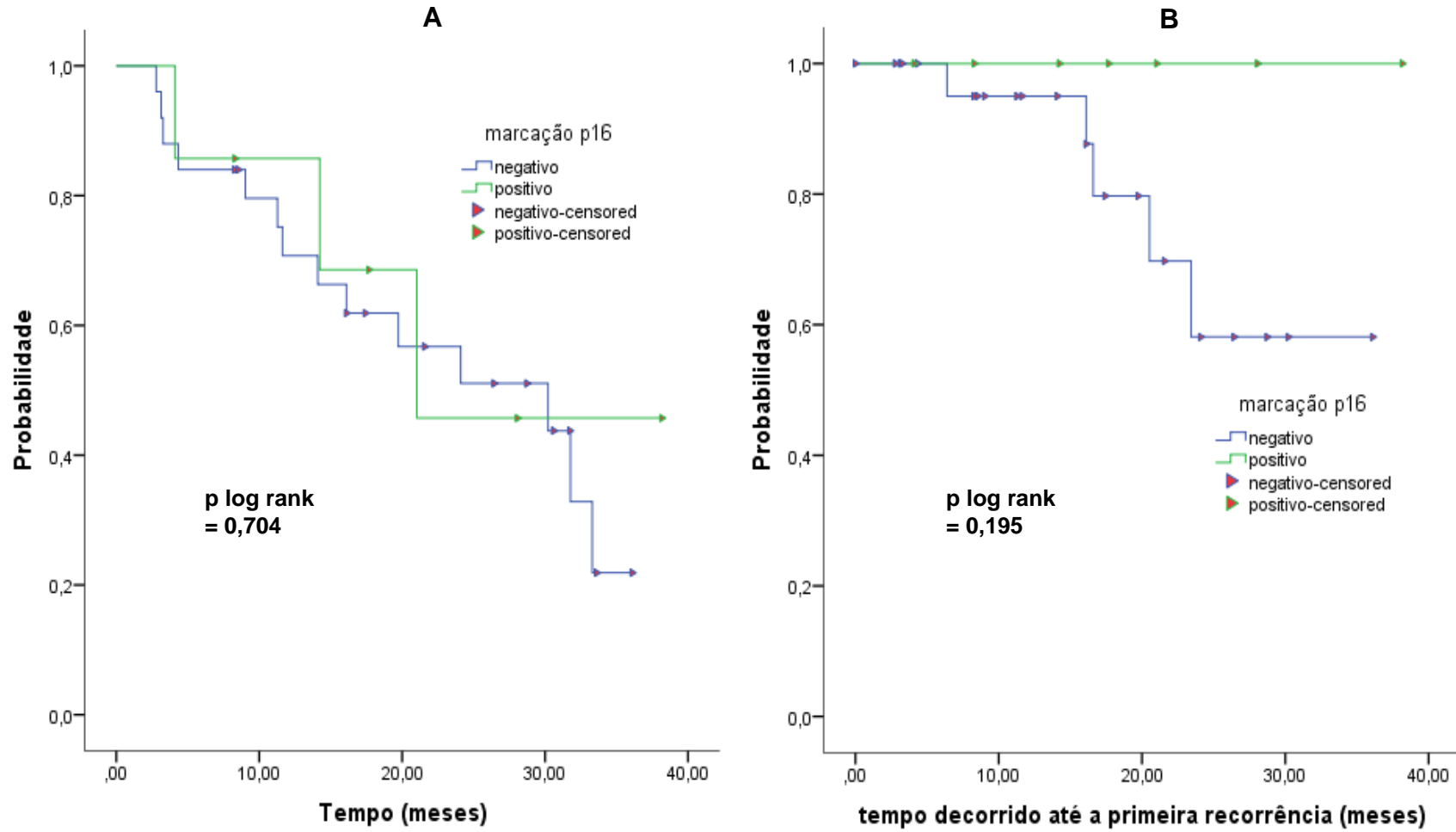


Figura 11. Sobrevida Doença-Específica (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) segundo a expressão de p16 avaliada pela técnica de IHC. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. As setas na curva representam dados censurados. A sobrevida foi calculada apenas incluindo os casos submetidos à técnica de imunohistoquímica

Analisando a figura 11, observamos que não foi detectada diferença entre a expressão de p16 e a sobrevida livre de doença ($P = 0,195$) e sobrevida doença-específica ($P = 0,704$). Possivelmente, esta falta de relação ocorreu devido ao reduzido número de tumores p16 positivos ($n = 7$). Na amostra analisada foi possível somente distribuir os tumores quanto à expressão de p16 e status de infecção por p16 em 2 grupos: tumores p16 positivos/HPV negativos e p16 negativo/HPV negativo ($n = 25$).

Segundo Lewis e colaboradores (2010), em indivíduos com CCE de orofaringe não existe diferença entre tumores p16 positivos/HPV positivos e tumores p16 positivos/HPV negativos, sendo estes dois grupos os que apresentaram as melhores respostas ao tratamento com maior sobrevida quando comparados aos indivíduos com tumores p16 negativos/HPV negativos. Neste caso, o uso da técnica de imunohistoquímica para avaliar a expressão do p16 seria um bom teste a ser utilizado na avaliação de risco em CCE de orofaringe, independente do *status* de infecção por HPV. Marur e colaboradores (2010) em seu estudo também confirmaram que a sobrevida entre tumores HPV positivos/p16 positivos são similares.

Dessa forma, comparando nossos resultados com o de outros estudos, não é possível afirmar que a análise de expressão do p16 por meio de imunohistoquímica pode ser utilizado como um marcador de prognóstico em CCE da cavidade bucal. Portanto, mais estudos utilizando maior número de casos e maior tempo de acompanhamento são necessários para confirmar a aplicabilidade da expressão de p16 como marcador de prognóstico.

5 CONCLUSÃO

A frequência de infecção pelo HPV em CCE da cavidade bucal foi baixa;

O *status* da infecção pelo HPV em CCE da cavidade bucal não mostrou-se um bom marcador de prognóstico, considerando as variáveis resposta ao tratamento e análise de sobrevida, devido ao reduzido número de tumores HPV positivos na amostra estudada;

O HPV pode ser um fator importante na tumorigênese do CCE da cavidade bucal, havendo necessidade de mais estudos devido à limitação deste estudo;

Pacientes que apresentaram maior sobrevida doença-específica foram aqueles com estadiamento inicial, tumores de menor tamanho, submetidos ao tratamento cirúrgico e sem metástase em linfonodos regionais;

A expressão de p16 não foi um indicador determinante da presença de HPV em amostras de CCE da cavidade bucal estudadas;

Não foi possível avaliar a aplicabilidade da expressão de p16 como marcador de prognóstico na população estudada. No entanto, observando o gráfico de sobrevida, acreditamos que ao aumentarmos o número de casos na amostra, poderíamos obter uma modificação neste resultado.

6 REFERÊNCIAS

- ANG, K. K. et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. **The new england journal of medicine**, v. 363, n. 1, p. 11, 2010.
- BELCHER, R. et al. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. **Journal of Surgical Oncology**, n. July, p. 551–574, 2014.
- BERNARDO, M.; NUNES, O. Tumores da cabeça e pescoço: o que há de novo na quimioterapia. **Cadernos Otorrinolaringologia**, v. 2, p. 1–12, 2010.
- BETIOL, J.; VILLA, L. L.; SICHERO, L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, p. 217–226, 2013.
- BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **TNM: Classificação de Tumores Malignos**. 6. ed. Rio de Janeiro, RJ: [s.n.]. p. 254
- BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal : uma revisão de literatura entre o perfil do paciente , estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63–69, 2007.
- CALEY, A. et al. Multicentric human papillomavirus – associated head and neck squamous cell carcinoma. **Head & Neck Oncology**, p. 1–7, 2014.
- CHAKROBARTY, B. et al. Relationship among tobacco habits, human papilloma virus (HPV) infection, p53 polymorphism/mutation and the risk of oral squamous cell carcinoma. **Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP**, v. 18, n. 2, p. 211–6, maio 2014.
- CHATURVEDI, A. K. et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. **Journal of clinical oncology**, v. 31, n. 36, p. 4550–9, 20 dez. 2013.
- COMBES, J.; FRANCESCHI, S. Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers. **Oral Oncology**, v. 50, n. 5, p. 370–379, 2014.
- DAYYANI, F. et al. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). **Head & neck oncology**, v. 2, p. 15, 2010.
- DUNCAN, L. D. et al. P16 Immunohistochemistry Can Be Used To Detect Human Papillomavirus in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 71, n. 8, p. 1367–75, ago. 2013.
- FAKHRY, C.; PSYRRI, A.; CHATURVEDHI, A. HPV and head and neck cancers : State-of-the-science. **Oral Oncology**, v. 50, n. 5, p. 353–355, 2014.

FERRARO, C. T. L. et al. Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 4, p. 451–459, 2011.

FERRAZ, L. D. C. et al. Ciclo celular , HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical : seleção de marcadores biológicos. **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 30, n. 2, p. 107–111, 2012.

GALBIATTI, A. L. S. et al. Head and neck cancer: Causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239–247, 2013.

GRAVITT, P. E. et al. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. **journal of clinical microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357–361, 2000.

GUPTA, K.; METGUD, R. Evidences Suggesting Involvement of Viruses in Oral Squamous. **Pathology Research International**, v. 2013, p. 1–17, 2013.

IARC; WHO. **Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>>.

JORDAN, R. C. et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. **The American journal of surgical pathology**, v. 36, n. 7, p. 945–54, jul. 2012.

KAMINAGAKURA, E. et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 130, n. 8, p. 1726–32, 15 abr. 2012.

KÖHLER, H. F.; KOWALSKI, L. P. Prognostic impact of the level of neck metastasis in oral cancer patients. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 78, n. 6, p. 15–20, 2012.

KREIMER, A. R. et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 14, n. 2, p. 467–475, 2005.

LEWIS, J. S. et al. p16 Positive Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: An Entity With a Favorable Prognosis Regardless of Tumor HPV Status. **Am J Surg Pathol.**, v. 34, n. 8, p. 1–20, 2010.

LEWIS, J. S. p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head and neck pathology**, v. 6, p. S75–82, jul. 2012.

LINGEN, M. W. et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. **Oral oncology**, v. 49, n. 1, p. 1–8, jan. 2013.

LOPES, V. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity rarely harbours oncogenic human papillomavirus. **Oral Oncology**, v. 47, p. 698–701, 2011.

LÓPEZ, R. V. M. et al. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. **Cancer causes & control : CCC**, v. 25, n. 4, p. 461–71, abr. 2014.

MARTÍN-HERNÁN, F. et al. Oral cancer , HPV infection and evidence of sexual transmission. **Oral Medicine and Pathology**, v. 18, n. 3, p. 439–444, 2013.

MARUR, S. et al. HPV-associated head and neck cancer : a virus-related cancer epidemic. **Lancet Oncology**, v. 11, n. 8, p. 781–789, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: [s.n.]. p. 124

MONTORO, J. R. D. M. C. et al. Fatores prognósticos no carcinoma espinocelular de cavidade oral. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 74, n. 6, p. 861–866, 2008.

MUÑOZ, N. et al. Chapter 1 : HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 3, p. 1–10, 2006.

NCCN. **National Comprehensive Cancer Network - Evidence-based cancer guidelines, oncology drug compendium, oncology continuing medical education**. Disponível em: <<http://www.nccn.org/>>.

OGUEJIOFOR, K. K. et al. The prognostic significance of the biomarker p16 in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Clinical oncology**, v. 25, n. 11, p. 630–8, nov. 2013.

PANNONE, G. et al. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. **Infectious agents and cancer**, v. 7, n. 1, p. 4, jan. 2012.

RAGIN, C. C. R.; TAIOLI, E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. **International Journal of Cancer**, v. 121, p. 1813–1820, 2007.

RIVERO, E. R. C.; NUNES, F. D. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population : amplification by PCR HPV em carcinoma epidermóide de boca em população brasileira : amplificação por PCR. **Brazilian Oral Research**, v. 20, n. 1, p. 21–24, 2006.

ROBINSON, M. et al. HPV specific testing: a requirement for oropharyngeal squamous cell carcinoma patients. **Head and neck pathology**, v. 6 Suppl 1, p. S83–90, jul. 2012.

SCHACHE, A G. et al. Validation of a novel diagnostic standard in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. **British journal of cancer**, v. 108, n. November 2012, p. 1332–9, 2013.

SHENG, Z. et al. Detection of high-risk human papillomavirus subtypes in cervical glandular neoplasia by in situ hybridization. v. 6, n. 10, p. 2168–2177, 2013.

SIMONATO, L. E.; MIYAHARA, G. I. O Papel do Papilomavírus Humano na Carcinogênese Bucal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 17, p. 471–476, 2007.

SKINNER, H. D. et al. Clinical characteristics of patients with multiple potentially human papillomavirus--related malignancies. n. June, p. 819–825, 2014.

SOUTO, R. O Papilomavírus Humano : um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 2, p. 155–160, 2005.

SPÍNDULA-FILHO, J. V. et al. Oral squamous cell carcinoma versus oral verrucous carcinoma: an approach to cellular proliferation and negative relation to human papillomavirus (HPV). **Tumor Biology**, v. 32, n. 2, p. 409–416, 2011.

TERMINE, N. et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: A meta-analysis (1988-2007). **Annals of Oncology**, v. 19, p. 1681–1690, 2008.

WEINBERGER, P. M. et al. Molecular Classification Identifies a Subset of Human Papillomavirus – Associated Oropharyngeal Cancers With Favorable Prognosis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 5, p. 736–747, 2006.

WENDT, M. et al. Presence of human papillomaviruses and p16 expression in hypopharyngeal cancer. **Head & Neck Oncology**, p. 1–6, 2013.

WESTRA, W. H. The Changing Face of Head and Neck Cancer in the 21st Century : The Impact of HPV on the Epidemiology and Pathology of Oral Cancer. **Head and Neck Pathology**, v. 3, p. 78–81, 2009.

WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature reviews cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.

ZARAVINOS, A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. **Oncotarget**, v. 5, n. 12, p. 3956–69, 30 jun. 2014.