



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

PRISCILA MARINHO DE ABREU

**INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E EXPRESSÃO DAS
PROTEÍNAS P16 E EGFR COMO BIOMARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E
OROFARÍNGEO**

VITÓRIA, ES

2020

PRISCILA MARINHO DE ABREU

**INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E EXPRESSÃO DAS
PROTEÍNAS P16 E EGFR COMO BIOMARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E
OROFARÍNGEO**

Tese 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 Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a. Dra. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler

VITÓRIA, ES

2020

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

A162i Abreu, Priscila Marinho de, 1984-
Infecção por papilomavírus humano e expressão das proteínas
p16 e EGFR como biomarcadores de prognóstico em carcinoma
epidermóide oral e orofaríngeo. / Priscila Marinho de Abreu. -
2020.

128 f. : il.

Orientadora: Sandra Lúcia Ventrin von Zeidler.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Boca - Câncer. 3.
Faringe - Câncer. 4. Marcadores biológicos de tumor. 5.
Papilomavírus. I. von Zeidler, Sandra Lúcia Ventrin. II.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da
Saúde. III. Título.

CDU: 61

PRISCILA MARINHO DE ABREU

**INFECÇÃO POR PAPILOMAVÍRUS HUMANO E EXPRESSÃO DAS
PROTEÍNAS P16 E EGFR COMO BIOMARCADORES DE
PROGNÓSTICO EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E
OROFARÍNGEO**

Tese 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 Doutor em Biotecnologia.

Apresentada em 30 de março de 2020.

**Prof^a. Dra. Sandra Lúcia Ventorin von
Zeidler
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora**

**Prof^a. Dra. Flávia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno**

**Prof^a. Dra. Greiciane Gaburro Panetto
Universidade Federal do Espírito Santo
Membro interno**

**Dr. José Roberto Vasconcelos de Podestá
Hospital Santa Rita de Cássia - AFECC
Membro externo**

**Prof^a. Dra. Rejane Faria Ribeiro-Rotta
Universidade Federal de Goiás
Membro externo**

**Prof^a. Silvia Helena Barem Rabenhorst
Universidade Federal do Ceará
Membro externo**

VITÓRIA, ES

2020

DEDICATÓRIA

A Deus, por me permitir a oportunidade de vivenciar todas essas experiências e por me permitir chegar até aqui. A Ele toda honra e toda glória.

À minha orientadora, prof. Sandra Ventrin von Zeidler, que em 2013 me acolheu, no mestrado, e desde então tem sido mais que uma orientadora, tem sido inspiração, vê potencial onde não vemos, disposta a contribuir ao máximo para o crescimento de cada orientado. E com certeza, aprendi muito e cresci muito com todo o aprendizado desses 7 anos de convivência.

Ao Laboratório de Patologia Molecular, por todo o aprendizado e experiências vividas desde o mestrado até aqui. Às pessoas que já passaram pelo laboratório e contribuíram seja com conhecimento, compartilhando histórias de vida, amizade. Algumas levarei comigo para a vida: Pedro, Taisnara, Isabella, Vinicius. À todas as meninas do grupo, que são como uma família, sempre dispostas a ajudar, acrescentar e a compartilhar conhecimento, e com certeza se cheguei até aqui, não cheguei sozinha, este trabalho leva um pouco de cada uma delas.

Aos meus pais, meus maiores incentivadores desde sempre e para sempre, que me ensinaram que o conhecimento é a única coisa na vida que ninguém pode nos tomar, e é o legado que espero deixar para minha filha.

Ao meu esposo, por todo o apoio, incentivo, compreensão com minhas ausências em alguns momentos (desde o mestrado) e por dividir a vida comigo. À minha filha, que me acompanhou durante todo esse período, minha maior motivação.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo, pela oportunidade do mestrado e agora, do doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) por fomentar e viabilizar a execução deste trabalho.

Ao Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes por ter proporcionado espaço físico para as entrevistas e coletas de amostras dos pacientes, o que permitiu o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Hospital Santa Rita de Cássia por toda a colaboração, por ceder espaço físico, profissionais capacitados, acessos aos prontuários e pela motivação na busca de resultados científicos que irão contribuir para a melhor qualidade de vida dos pacientes com câncer.

Ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes e do Hospital Santa Rita de Cássia, em especial ao Dr. José Roberto Vasconcelos de Podestá, por permitirem o acompanhamento às consultas dos pacientes e por todo aprendizado. Um agradecimento especial também ao Dr. Agenor Sena, que me permitiu acompanhar seus atendimentos desde o mestrado no Hospital Santa Rita de Cássia.

Ao professor Hisham Mehanna, diretor do *Institute of Head and Neck Studies and Education* da *University of Birmingham*, Reino Unido, pela colaboração, e à *University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust*, por permitir o acesso às amostras biológicas.

Ao Laboratório Multiusuário de Histotécnicas da UFES pela montagem de lâminas e blocos, e principalmente às técnicas, Lucienne Bessoni Oliveira e Viviane Coutinho Meneguzzi, por todo o auxílio nos experimentos e por todo conhecimento transmitido.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Não podemos esquecer que quando o [elemento] rádio foi descoberto, ninguém sabia que ele seria útil em hospitais [para tratar câncer]. Era um trabalho de ciência pura, e isso é prova de que um trabalho científico não deve ser avaliado do ponto de vista de sua utilidade direta. Ele precisa ser feito por si só, pela beleza da ciência”.

(Marie Curie)

RESUMO

ABREU, P.M. **Infecção por Papilomavírus Humano e expressão das proteínas p16 e EGFR como biomarcadores de prognóstico em carcinoma epidermóide oral e orofaríngeo**. 2020. 128f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O carcinoma epidermoide (CE) oral e orofaríngeo tem como principais fatores de risco o consumo de tabaco, álcool e a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV). Estudos indicam que pacientes HPV-positivos apresentam resultados mais favoráveis em relação à sobrevida e à resposta ao tratamento radioquimioterápico. Em orofaringe, as diretrizes mundiais para a identificação e tratamento do câncer preconizam que a proteína p16 é um importante indicador prognóstico, uma forma indireta de se avaliar a infecção por HPV. Mas, estudos mostram que não há uma relação absoluta entre a expressão da proteína e a presença do vírus. Ainda, estudos indicam relação entre tumores HPV-negativos e a alta expressão do Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR), altamente expresso em CE oral e orofaríngeo e já utilizado como alvo para imunoterapia. O objetivo deste estudo foi avaliar a aplicabilidade dos biomarcadores HR-HPV (do inglês *High Risk – Human Papillomavirus*), EGFR e p16 como indicadores de prognóstico e da resposta ao tratamento em CE oral e orofaríngeo. A presença de p16 e EGFR foi realizada por imuno-deteção em lâminas de microarranjos teciduais (TMA, do inglês *Tissue Microarray*) contendo amostras tumorais de epitélio adjacente ao tumor, tecido displásico e tecido tumoral. A detecção do DNA do HPV foi realizada através de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). A detecção do RNAm E6/E7 do HPV foi realizada através da Hibridização *in situ* utilizando sondas de RNA (ISH-RNA). A imuno-expressão de p16, EGFR e o status HPV foram associados às variáveis clínico-patológicas e fatores de risco. Curvas de Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de doença (SLD) foram obtidas pelo método de Kaplan–Meier. Elevada expressão de EGFR esteve relacionada com o maior tamanho do tumor em CE oral. A frequência de HPV encontrada em CE oral e orofaríngeo empregando PCR foi 2,25%. Com a técnica ISH-RNA, observou-se frequência de 8,08% em CE oral e 10% em CE orofaríngeo. Foi encontrada relação entre p16 e a presença de RNAm E6/E7 em CE oral ($p=0,046$), mas não em CE orofaríngeo. Observou-se correlação

crescente e significativa entre p16 e HPV ($p=0,007$), porém foi detectada uma correlação fraca entre as duas variáveis ($r_s=0,239$). Embora a presença de HPV, detectado por ISH-RNA, não tenha impactado diretamente na SG ou SLD, observou-se que todos os pacientes HPV-positivos se enquadraram no grupo de baixo risco, os quais tiveram as maiores taxas de SG ($p=0,028$). Em conclusão, p16 e EGFR podem não ser bons biomarcadores de prognóstico ou progressão. No entanto, a expressão de p16 pode ser utilizada como uma importante ferramenta para rastreamento na rotina clínica. ISH-RNA parece ter maior sensibilidade que a PCR convencional e a correlação fraca entre a expressão de p16 e a detecção de RNAm E6/E7 HPV por ISH leva a concluir que utilizar a expressão do p16 isoladamente pode não ser a melhor opção para prever a infecção por HPV. A baixa frequência de HPV observada pode indicar que a cavidade oral é um sítio anatômico incomum para o HPV, não sendo determinante para a carcinogênese oral e que HPV ainda não é fator causal predominante para a carcinogênese em orofaringe, como é em outros países, prevalecendo os hábitos tabagistas e etilistas.

Palavras-chave: Papilomavírus humano. EGFR. p16. Hibridização in situ-RNA. Carcinogênese induzida por HPV.

P16 AND EGFR EXPRESSION AND HPV INFECTION AS PROGNOSTIC BIOMARKERS IN ORAL AND OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

ABSTRACT

ABREU, P.M. Human Papillomavirus infection and expression of p16 and EGFR proteins as prognostic biomarkers in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. 2020. 128f. Thesis (Doctoral in Biotechnology) or Dissertation - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma has as main risk factors the consumption of tobacco, alcohol and infection by Human Papillomavirus (HPV). Studies indicate that HPV-positive patients have results more favorable in relation to survival and response to radiochemical treatment. In the oropharynx, the worldwide guidelines for the identification and treatment of cancer recommend that p16 protein is an important prognostic indicator, an indirect way of assessing HPV infection. But studies show that there is no absolute relationship between protein expression and the presence of the virus. In addition, studies indicate a relationship between HPV-negative tumors and high expression of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), highly expressed in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and already used as a target for immunotherapy. The aim of this study was to evaluate the applicability of HR-HPV biomarkers EGFR and p16 as indicators of prognosis and response to treatment in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. The presence of p16 and EGFR was performed by immuno-detection on tissue microarray slides (TMA, from English Tissue Microarray) containing tumor samples from epithelium adjacent to the tumor, dysplastic tissue and tumor tissue. The detection of HPV DNA was performed using Polymerase Chain Reaction (PCR). The detection of HPV E6 / E7 mRNA was performed by in situ hybridization using RNA probes (ISH-RNA). Immunoexpression of p16, EGFR and HPV status were associated with clinical-pathological variables and risk factors. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) curves were obtained using the Kaplan – Meier

method. Elevated EGFR expression was related to the larger tumor size in oral squamous cell carcinoma. The frequency of HPV found in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma using PCR was 2.25%. With the ISH-RNA technique, a frequency of 8.08% was observed in oral squamous cell carcinoma and 10% in oropharyngeal squamous cell carcinoma. A relationship was found between p16 and the presence of E6 / E7 mRNA in oral squamous cell carcinoma ($p = 0.046$), but not in oropharyngeal squamous cell carcinoma. There was an increasing and significant correlation between p16 and HPV ($p = 0.007$), but a weak correlation was detected between the two variables ($r_s = 0.239$). Although the presence of HPV, detected by ISH-RNA, did not directly impact on OS or DFS, it was observed that all HPV-positive patients fell into the low-risk group, which had the highest OS rates ($p = 0.028$). In conclusion, p16 and EGFR may not be good prognostic or progression biomarkers. However, the expression of p16 can be used as an important tool for routine screening. ISH-RNA seems to have greater sensitivity than conventional PCR and the weak correlation between p16 expression and detection of E6 / E7 HPV RNA by ISH leads to the conclusion that using p16 expression alone may not be the best option to predict the HPV infection. The low frequency of HPV observed may indicate that the oral cavity is an unusual anatomical site for HPV, not being a determinant for oral carcinogenesis and that HPV is not yet a predominant causal factor for oropharyngeal carcinogenesis, as it is in other countries, prevailing smoking and drinking habits.

Key words: Human papillomavirus. EGFR. p16. *In situ* hybridization-RNA. HPV-induced carcinogenesis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Taxas de incidência de câncer de lábio, cavidade oral e orofaringe estimadas para homens e mulheres em 2018. ASR – Taxas padronizadas por idade, por 100 mil habitantes. Fonte: GLOBOCAN, 2018.....21
- Figura 2.** Taxas de incidência de câncer de lábio e cavidade oral no Brasil estimadas para homens e mulheres em 2020, por 100 mil habitantes. Fonte: INCA, 2020.22
- Figura 3.** Incidência de câncer atribuída a infecção por Papilomavírus humano (HPV) entre homens e mulheres (A), entre homens (B), e entre mulheres (C) em 2012, de acordo com a localização geográfica, segundo dados do Globocan.....24
- Figura 4.** Estimativa de novos casos de câncer de orofaringe em homens, para 2018, de acordo com a localização geográfica, segundo dados do Globocan.....24
- Figura 5.** Integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7 e interferência nas funções de p53 e pRb. Adaptado de WOODMAN et al, 2007; JANICEK; AVERETTE, 2001.....31
- Figura 6.** Tipos de amostra utilizados, origem e distribuição de acordo com cada técnica adotada.40
- Figura 7** Sequência de etapas para a hibridização *in situ* utilizando sondas de RNA. Adaptado de: ACD - Advanced Cell Diagnostics Inc.47
- Figura 8.** Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) em 60 meses associada à infecção por HPV em orofaringe. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados .61
- Figura 9.** Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) em 60 meses associada aos grupos de risco avaliados em orofaringe. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados.....64

Figura 10. Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) em 60 meses associada à expressão de EGFR em cavidade oral. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados.....70

Figura 11. Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) em 60 meses associada à expressão de p16 em cavidade oral. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados.....71

Figura 12. Sobrevida Global em 60 meses associada à infecção por HPV (A, D), expressão de p16 (B, D) e expressão de EGFR (C, F) em CE da cavidade oral nas amostras do Brasil e do Reino Unido. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados.72

Figura 13. Sobrevida Livre de Doença em 60 meses associada à infecção por HPV (A, D), expressão de p16 (B, D) e expressão de EGFR (C, F) em CE da cavidade oral nas amostras do Brasil e do Reino Unido. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados.....73

Figura 14. Fotomicrografias da imunomarcacão de p16 e EGFR nos segmentos epitélio adjacente (A, D), displasia (B, E) e tumor (C, F), considerando as marcações nuclear e citoplasmática para p16 e marcação membranar para EGFR. Marcações referentes à baixa expressão de EGFR e p16 podem ser observadas em A e D, enquanto as referentes à alta expressão podem ser observadas em C e F. Comparação entre as médias de expressão, em boxplot, de acordo com os resultados obtidos com o teste de Kruskal-Wallis para a expressão de EGFR (G) e p16 (H). Aumento de 400x (A, B, C, D, E, e F).....75

Figura 15. Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) em 60 meses associada à expressão de p16 em orofaringe. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados.....78

Figura 16. Comprovante de aceite do artigo “Frequency of HPV in oral squamous carcinoma” para publicação (A) e Classificação no Qualis Capes, na área de Biotecnologia (B).85

Figura 17. Comprovante de submissão do artigo “Human Papillomavirus E6/E7 mRNA detection by in situ hybridization in oral cavity squamous cell carcinoma” p o periódico Archives of oral biology (A) e Classificação no Qualis Capes, na área Biotecnologia (B).106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estudos de detecção de HPV em tumores da cavidade oral e orofaringe, população estudada, técnicas aplicadas e frequências de HPV associadas a cada estudo.	26
Tabela 2. Mistura para as PCR realizadas para detecção de HPV.....	45
Tabela 3. Caracterização da amostra, de acordo com o tipo de amostra e o sítio anatômico estudados (<i>continua</i>).	52
Tabela 4. Associação entre a infecção por HPV e as variáveis clínicas e fatores de risco tabagismo e etilismo em carcinoma epidermóide oral e orofaríngeo.....	55
Tabela 5. Detecção de RNAm E6/E7 HPV por Hibridização in situ em carcinoma epidermoide oral e orofaríngeo, e sua associação com as variáveis clínicas, fatores de risco e expressão de p16 e EGFR, avaliadas por sítio anatômico (<i>continua</i>).	58
Tabela 6. Associação entre expressão de p16 e EGFR com fatores de risco em carcinoma epidermóide da cavidade oral HPV-negativos.	60
Tabela 7. Análise imuno-histoquímica da expressão de p16 e EGFR em carcinoma epidermoide oral e sua associação com as variáveis clínicas e os fatores de risco tabagismo e etilismo.....	66
Tabela 8. Associação por sexo entre expressão de p16 e EGFR com fatores prognósticos e fatores de risco em carcinoma epidermóide da cavidade oral.	67
Tabela 9. Distribuição dos segmentos epitétio adjacente, displasia e tumor e comparação entre as médias de expressão.....	74
Tabela 10. Análise imuno-histoquímica da expressão de 16 em carcinoma epidermóide orofaríngeo e sua associação com as variáveis clínicas e os fatores de risco tabagismo e etilismo, em ambos os sexos e somente no sexo masculino.	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE	Carcinoma epidermoide
E6	Oncoproteína E6, originada do gene E6 do genoma do HPV
E7	Oncoproteína E7, originada do gene E6 do genoma do HPV
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal (do inglês <i>Epidermal growth fator receptor</i>)
HPV	Papilomavírus humano (do inglês <i>Human Papillomavírus</i>)
HR-HPV	Papilomavírus Humano de alto risco (do inglês <i>High Risk – Human Papillomavírus</i>)
ISH	Hibridização in situ (do inglês <i>in situ hybridization</i>)
ISH-RNA	Hibridização in situ utilizando sondas de RNA (RNA mensageiro)
mRNA	RNA mensageiro (do inglês <i>messenger RNA</i>)
Nested PCR	Reação em cadeia da polimerase aninhada (do inglês <i>Nested Polymerase Chain Reaction</i>)
p16	Proteína p16
PBS-BSA	Tampão fosfato salino com soroalbumina bovina (do inglês <i>phosphate buffered saline – bovine serum albumin</i>)
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase chain reaction</i>)
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _m E6/E7	RNA mensageiro que dará origem às oncoproteínas E6 e E7 na etapa de tradução

RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de PCR quantitativa (do inglês <i>reverse transcriptase – quantitative polymerase chain reaction</i>)
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida livre de doença
TBS	Tampão Tris Salino (do inglês <i>Tris-buffered saline</i>)
TMA	Microarranjo tecidual (do inglês <i>tissue microarray</i>)
TRIS-SDS	Tampão tris com dodecil sulfato de sódio (do inglês <i>Tris-sodium dodecyl sulphate</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 EPIDEMIOLOGIA	21
1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	27
1.3 DETECÇÃO DE HPV	31
1.4 PROTEÍNA p16	33
1.5 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGFR).....	35
2 OBJETIVOS.....	38
2.1 OBJETIVO GERAL	38
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3 MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 AMOSTRAGEM	39
3.2 MICROARRANJO TECIDUAL (<i>TISSUE MICROARRAY - TMA</i>)	41
3.3 DETECÇÃO DE HPV	43
3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	43
3.3.2 Hibridização <i>in situ</i> – RNA.....	46
3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA	48
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
4 RESULTADOS.....	51
4.1 DETECÇÃO DE HPV – REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE	54

4.2 DETECÇÃO DE HPV – HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> -RNA	55
4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	65
4.3.1 Expressão de p16 e EGFR em amostras provenientes da cavidade oral..	65
4.3.2 Expressão de p16 em amostras provenientes de orofaringe	76
5 DISCUSSÃO	79
5.1 DETECÇÃO DE HPV	79
5.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA EM CAVIDADE ORAL E OROFARINGE	81
5.3 ARTIGOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DA TESE	84
Manuscrito 1 - Frequency of HPV in oral squamous carcinoma.....	84
Manuscrito 2 - Human Papillomavirus E6/E7 mRNA detection by <i>in situ</i> hybridization in oral cavity squamous cell carcinoma	106
6 CONCLUSÕES	114
7 PERSPECTIVAS.....	116
REFERÊNCIAS.....	117
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE	123
ANEXO B - PARECER DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA.....	125
ANEXO C - PARECER DO NATIONAL RESEARCH ETHICS SERVICE.....	127

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer é considerado um problema de saúde pública mundial, sendo o câncer de cabeça e pescoço o sexto mais prevalente no mundo. Para o ano de 2018, foram estimados 447.751 novos casos de câncer de lábio, cavidade oral e orofaringe, em homens e mulheres, e 228.389 óbitos. O Brasil é um dos países que apresentam as maiores taxas de incidência destes tipos tumorais (Figura 1), equivalentes a mais de 5,9 a cada 100 mil habitantes (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018). Ainda no Brasil, para os cânceres de lábio e cavidade oral (Figura 2), o estado do Espírito Santo apresenta as taxas de incidência mais elevadas para homens comparado às mulheres, equivalentes a 11,87 e 2,04 a cada 100 mil habitantes, respectivamente (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2020).

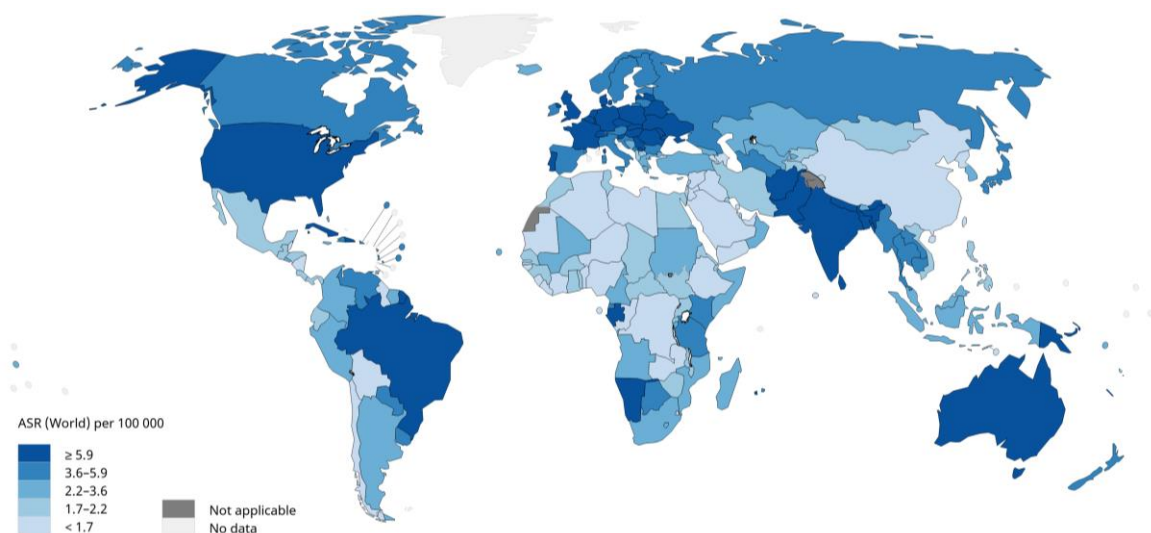


Figura 1. Taxas de incidência de câncer de lábio, cavidade oral e orofaringe estimadas para homens e mulheres em 2018. ASR – Taxas padronizadas por idade, por 100 mil habitantes. Fonte: GLOBOCAN, 2018.

Dentre os tumores que acometem a cavidade oral e orofaringe, o tipo histológico mais frequente é o carcinoma epidermoide (CE), neoplasia maligna com origem em epitélio de revestimento que representa mais de 95% dos casos (BRENER et al., 2007; GUPTA; METGUD, 2013).

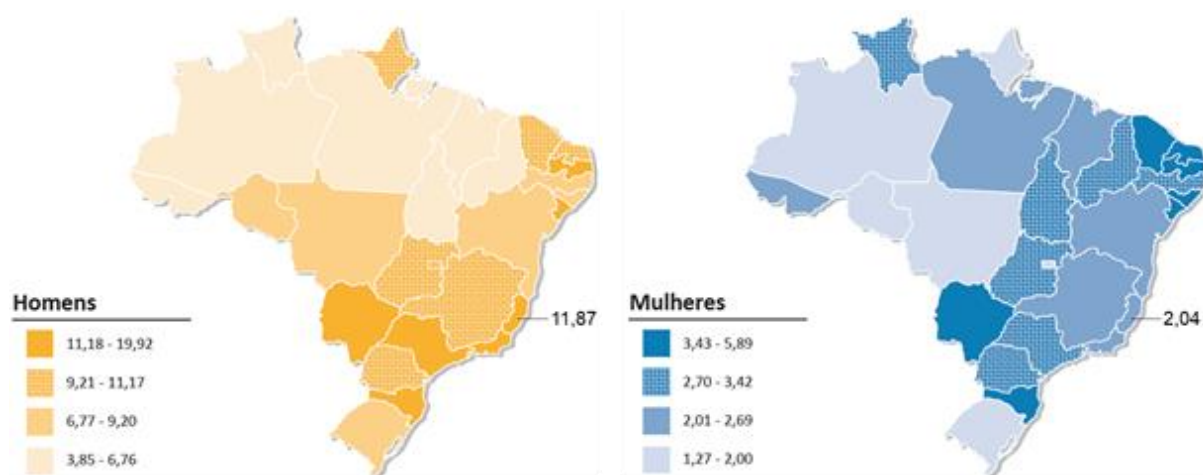


Figura 2. Taxas de incidência de câncer de lábio e cavidade oral no Brasil estimadas para homens e mulheres em 2020, por 100 mil habitantes. Fonte: INCA, 2020.

O CE oral e orofaríngeo tem como principais fatores de risco o tabagismo e o etilismo. Isoladamente, a queima do tabaco libera nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos carcinogênicos genotóxicos, responsáveis pela alteração do perfil molecular e pela indução de mutações nas células; já o álcool atua como solvente e facilita a exposição da mucosa a agentes carcinogênicos, levando à maior absorção das substâncias presentes no tabaco, além de interferir na síntese e reparo do DNA através da formação de adutos de DNA por seu principal metabólito, o acetaldeído (GALBIATTI et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2020). Concomitantemente, o consumo de álcool e tabaco produz efeito sinérgico, contribuindo para um aumento em 30 vezes do risco de carcinoma epidermoide em cabeça e pescoço. Esse risco também pode variar conforme o tempo, quantidade e frequência de exposição aos fatores de risco (GALBIATTI et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2020).

Além do álcool e tabaco, que já são fatores de risco bem estabelecidos, tem sido também apontada a participação do Papilomavírus Humano (HPV) na carcinogênese dos tumores de cabeça e pescoço, principalmente no carcinoma epidermoide de orofaringe (COMBES; FRANCESCHI, 2014; WESTRA, 2009; ZARAVINOS, 2014). Apesar das hipóteses em relação à função do HPV na gênese dos tumores de cabeça e pescoço, ainda não está bem estabelecida a participação

do HPV no desenvolvimento dos tumores da cavidade oral, sendo que a maioria dos estudos tem relacionado infecção por HPV com tumores de orofaringe. Ainda, os mecanismos envolvidos na patogênese do câncer de cabeça e pescoço relacionados ao HPV, principalmente em cavidade oral, não estão bem esclarecidos.

A participação do HPV nos tumores de orofaringe tem sido sustentada pela hipótese de que, nos últimos anos, tem sido observada a redução no consumo de tabaco não acompanhada de uma redução na incidência dos tumores de cabeça e pescoço. Contrariamente, a incidência dos tumores de orofaringe nos últimos 20 anos tem aumentado, o que pode estar fortemente relacionado à infecção pelo HPV (CHATURVEDI et al., 2013; OGUEJIOFOR et al., 2013). Além disso, o perfil dos pacientes com tumores de cabeça e pescoço tem sofrido mudanças, sendo diagnosticados em indivíduos mais jovens, do sexo masculino e sem histórico de tabagismo e etilismo. Esse perfil tem sido atribuído à infecção por HPV, e devido à melhor resposta ao tratamento radioquimioterápico que estes pacientes têm apresentado em comparação com pacientes HPV-negativos, os tumores HPV-positivos tem sido considerados uma entidade distinta, um subconjunto dentre os tumores de cabeça e pescoço, com prognóstico mais favorável (BRAY; FERLAY; SOERJOMATARAM, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2018; NAUTA et al., 2018; WESTRA, 2009).

As estimativas do estudo GLOBOCAN, realizado pelo IARC (International Agency for Research on Cancer), confirmam este perfil. De acordo com o GLOBOCAN, a incidência de todos os cânceres atribuídos ao HPV em homens por cada continente em 2012 (Figura 3) é bem próxima à incidência global de câncer em orofaringe em 2018 (Figura 4). Portanto, em homens, o HPV parece ser o principal fator de risco para o câncer de orofaringe.

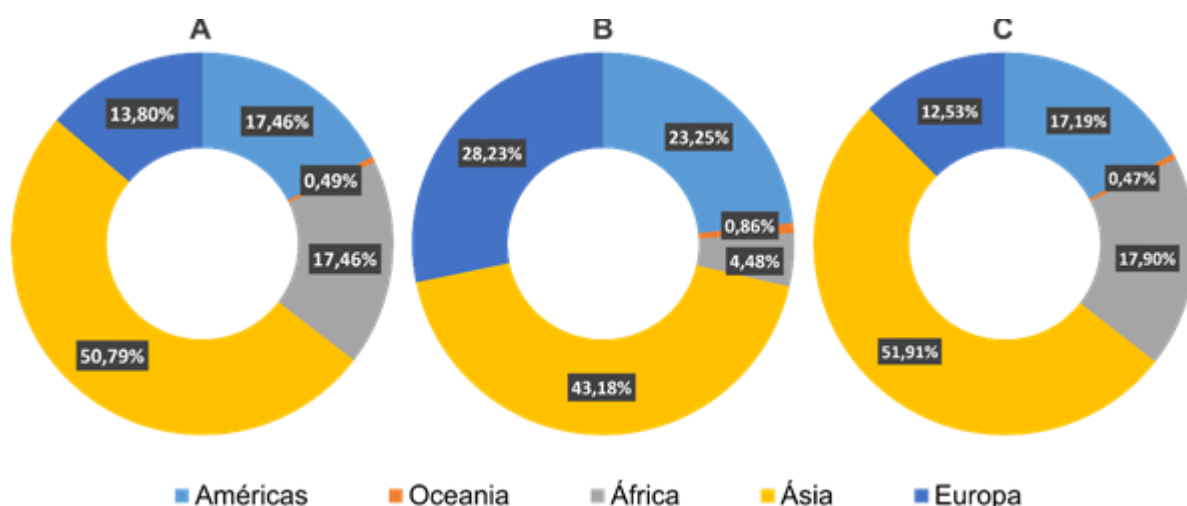


Figura 3. Incidência de câncer atribuída a infecção por Papilomavírus humano (HPV) entre homens e mulheres (A), entre homens (B), e entre mulheres (C) em 2012, de acordo com a localização geográfica, segundo dados do Globocan.

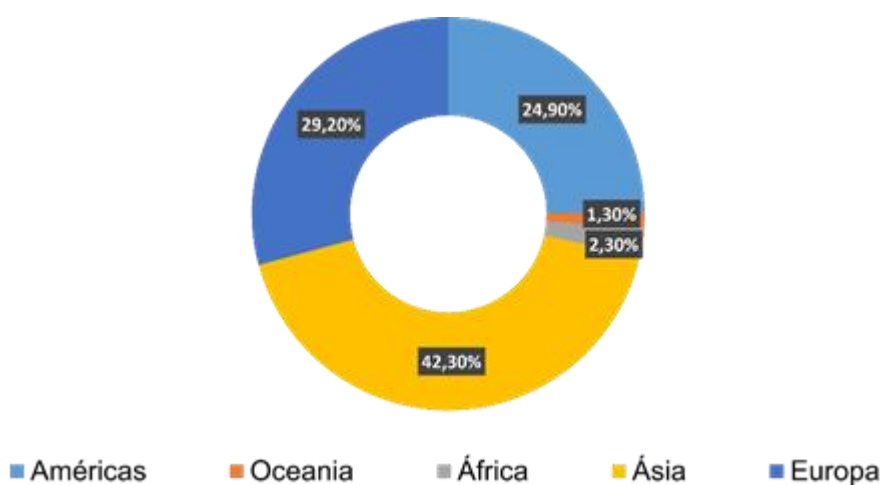


Figura 4. Estimativa de novos casos de câncer de orofaringe em homens, para 2018, de acordo com a localização geográfica, segundo dados do Globocan.

A frequência da infecção por HPV em tumores da cavidade oral é 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 tumores da cavidade oral 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 orais analisados.

No Brasil, diferentes estudos realizados mostraram variações na frequência de infecção pelo HPV: desde 19,2% em CE oral, 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). Um estudo do nosso grupo, publicado em 2018, mostrou baixa frequência da infecção, equivalente a 3,03% dos tumores avaliados (ABREU et al., 2018).

Para o CE orofaríngeo, estudos mostram que há, de forma geral, uma frequência de HPV mais expressiva do que em CE oral. Uma revisão sistemática, publicada por Haeggbloom e colaboradores (2017), mostrou prevalência total de 56% de HPV em carcinoma epidermoide de base de língua e tonsila. Na Espanha, estudo publicado por Castellsagué et al.(2016) revelou frequência de 83% de HPV-16 em CE orofaríngeo, enquanto na Holanda, estudo publicado por Nauta e colaboradores (2018) observaram 87,6% de casos HPV positivos em 388 pacientes com CE orofaríngeo avaliados, conforme tabela 1.

Tabela 1. Estudos de detecção de HPV em tumores da cavidade oral e orofaringe, população estudada, técnicas aplicadas e frequências de HPV associadas a cada estudo.

Autor/Ano	Sítio Anatômico	População estudada	Técnica	Frequência
Abreu et al., 2018	Cavidade Oral	Espírito Santo - Brasil	PCR (MY09/11; GP5+/6+; PGMY09/11)	3,03%
Castellsagué et al., 2016	Cavidade Oral	Vários países - Estudo internacional	ISH-DNA, IHC p16, PCR (SPF-10)	68,8%
Chakrobarty et al., 2014	Cavidade Oral	Índia	PCR (MY09/11)	46%
Hauck et al., 2015	Cavidade Oral	Alemanha	PCR (GP5+/6+) ISH-DNA, ISH-RNA	3,8%
Hauck et al., 2015	Cavidade Oral	Brasil	PCR (GP5+/6+) ISH-DNA, ISH-RNA	6%
Kaminagakura et al., 2012	Cavidade Oral	São Paulo - Brasil	PCR (GP5+/6+)	19,2%
Lingen et al., 2013	Cavidade Oral	Estados Unidos	RT-qPCR	5,9%
Lopes et al., 2011	Cavidade Oral	Reino Unido	PCR (GP5+/6+); qPCR; ISH-DNA	<2%
López et al., 2014	Cavidade Oral	São Paulo, Goiás, Rio de Janeiro - Brasil	PCR (PGMY09/11)	6,6%
Spíndula-Filho et al., 2011	Cavidade Oral	Goiás, Brasil	PCR (GP5+/6+)	0%
Castellsagué et al., 2016	Orofaringe	Vários países - Estudo internacional	ISH-DNA, IHC p16, PCR (SPF-10)	83%
Haeggbloom et al., 2017	Orofaringe	Vários países - Revisão Sistemática	PCR, IHC p16, ISH, RT-qPCR	56%
Hauck et al., 2015	Orofaringe	Alemanha	PCR (GP5+/6+) ISH-DNA, ISH-RNA	34,4%
Hauck et al., 2015	Orofaringe	Brasil	PCR (GP5+/6+) ISH-DNA, ISH-RNA	15,5%
López et al., 2014	Orofaringe	São Paulo, Goiás, Rio de Janeiro - Brasil	PCR (PGMY09/11)	6,6%
Nauta et al., 2018	Orofaringe	Holanda	PCR (GP5+/6+)	87,6%

A variabilidade nas frequências deve ser atribuída também aos variados métodos de detecção viral. Porém, quanto maior a sensibilidade do método utilizado, melhor a detecção e maiores são as possibilidades de uso do *status* HPV como biomarcador de prognóstico e resposta ao tratamento, o que favorece a estratificação dos pacientes para uma melhor escolha das modalidades de tratamento disponíveis.

A detecção precoce do CE oral e orofaríngeo, em estágios iniciais da tumorigênese, proporciona maiores chances de cura. No entanto, a maioria dos casos é diagnosticada em estágio avançado, o que dificulta as possibilidades de cura, com queda na qualidade de vida do indivíduo. Isto pode explicar porque, mesmo com os avanços nas modalidades de tratamento, a taxa de sobrevida não tem obtido melhoras significativas nas últimas décadas, mantendo-se entre 50-55%, em um período de 5 anos (GALBIATTI et al., 2013; SAYÁNS et al., 2019; ZARAVINOS, 2014).

Além disso, a escolha terapêutica a ser adotada por muito tempo tem sido baseada na classificação TNM do tumor e no sítio anatômico acometido. Porém, pacientes com mesmo estadiamento podem não responder como o esperado a um mesmo tratamento. Isto possivelmente deve-se a fatores biológicos envolvidos, como as variabilidades genéticas individuais, que podem influenciar na progressão e disseminação local da neoplasia. Com isso, estudos de biomarcadores de prognóstico tumorais podem auxiliar na decisão terapêutica, com base na resposta ao tratamento em pacientes com CE oral e orofaríngeo.

1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O papilomavírus 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 são divididos 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 (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013; FERRAZ et al., 2012; MUÑOZ, Nubia et al., 2006).

Os genes E1 e E2 têm a função de codificar proteínas essenciais para replicação do DNA 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 se ligando 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 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 e 82 (MUÑOZ, Nubia 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 anogenital (KAMINAGAKURA et al., 2012;

MARUR et al., 2010; ZARAVINOS, 2014) e orofaringe (CHATURVEDI et al., 2013; LÓPEZ et al., 2014; MUÑOZ, Nubia 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 nessas células após perda da solução de continuidade do tecido, quando então se estabelece uma relação entre o ciclo viral e a diferenciação da célula infectada (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013).

O DNA na forma epissomal é responsável apenas pela replicação viral. No ciclo replicativo da infecção pelo HPV, há um baixo número de cópias do DNA viral na forma epissomal 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 e sua migração no epitélio. Para as partículas virais serem produzidas, ocorre a amplificação do genoma do HPV e montagem das partículas nas camadas média e superior 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 através da sua capacidade de se associar a filamentos de citoqueratina e de reorganizar a rede de filamentos de citoqueratina na célula, maturação e replicação viral. A montagem dos vírus e seu empacotamento ocorrem na camada superficial do epitélio de onde são liberadas as partículas virais completas sem que haja lise celular (FERRAZ et al., 2012).

A carcinogênese induzida por HPV difere da carcinogênese induzida por tabaco e álcool. Quando induzida por HPV, 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, na qual é observada a integração do genoma viral ao da célula hospedeira, em vez de manter o DNA na forma epissomal (FERRAZ et al., 2012). Quando o genoma viral se integra ao genoma da célula hospedeira, o DNA viral é clivado na região onde se localizam 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 esse controle perdido em decorrência da clivagem, provocando um aumento

da expressão dessas proteínas. Ao final desse processo se observa o HPV transcricionalmente ativo, o que caracteriza uma infecção por HPV biologicamente relevante (SIMONATO; MIYAHARA, 2007; SOUTO, 2005). Os eventos decorrentes da integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira podem ser visualizados na Figura 5.

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, provocada 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, nos quais 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 e encontrados em cerca de 70% dos casos (BETIOL; VILLA; SICHERO, 2013).

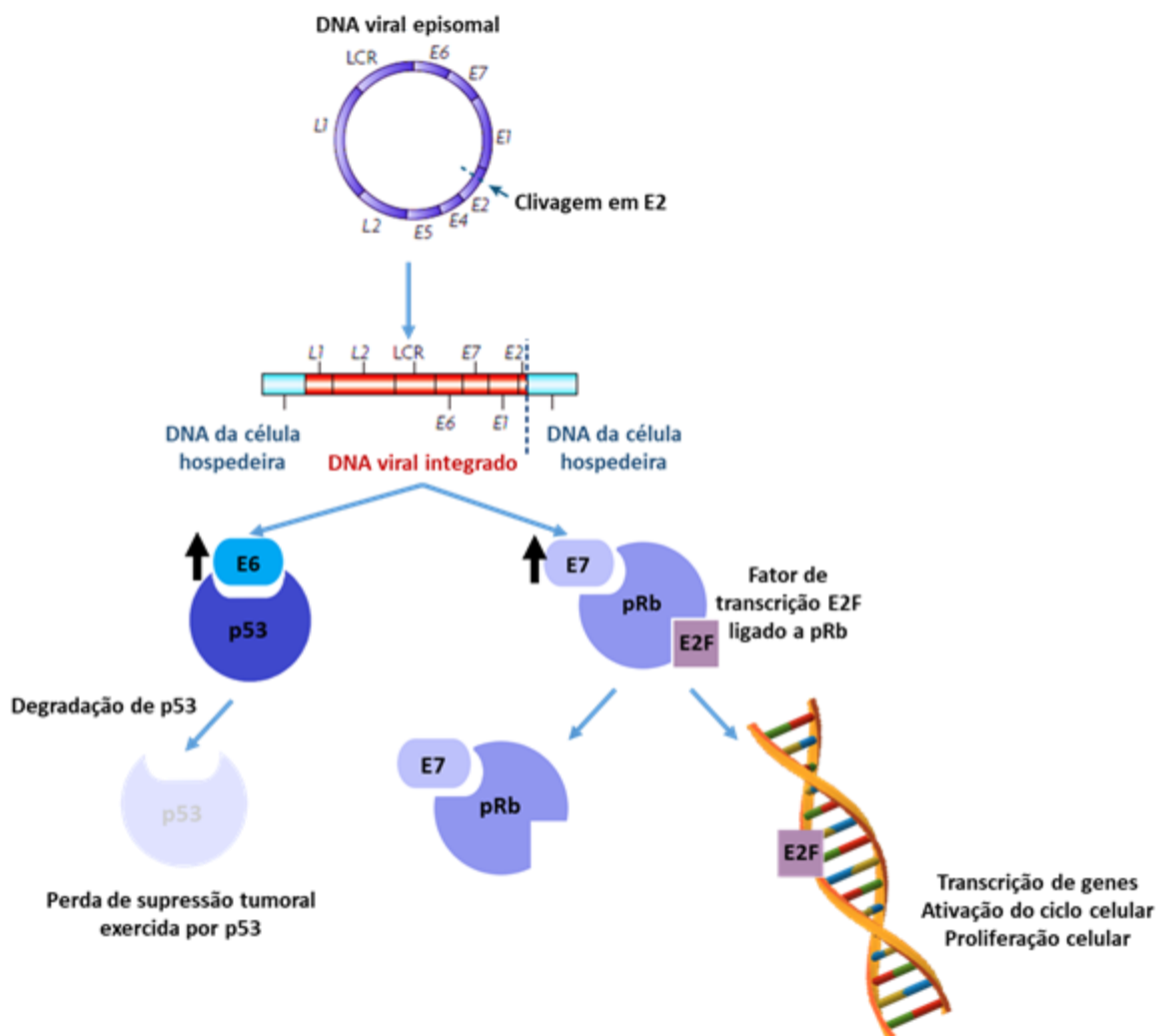


Figura 5. Integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, aumento da expressão das oncoproteínas E6 e E7 e interferência nas funções de p53 e pRb. Adaptado de WOODMAN et al, 2007; JANICEK; AVERETTE, 2001.

1.3 DETECÇÃO DE HPV

A detecção de HPV baseada em DNA foi utilizada durante muitos anos, através de reação em cadeia de polimerase (PCR) convencional, nested PCR e hibridização *in situ* utilizando sondas de DNA. Porém, estas técnicas identificam apenas a presença do HPV no tecido e não são capazes de garantir a participação do vírus na carcinogênese da cavidade oral e orofaringe (SCHACHE, Andrew G et al., 2012; UKPO et al., 2011).

A detecção dos transcritos referentes às oncoproteínas E6 e E7, através de PCR em tempo real (RT-qPCR) atualmente é o padrão ouro para a detecção do HPV, já que permite a detecção do RNAm E6 e E7, e assim garante que o HPV não somente está presente no tumor, mas está transcricionalmente ativo, caracterizando infecção biologicamente relevante, o que significa que o HPV está participando ativamente na carcinogênese desses tumores. Porém, essa técnica não preserva o contexto do tecido, ou seja, é necessário a destruição do tecido para se ter acesso aos ácidos nucleicos (SCHACHE, a G et al., 2013; UKPO et al., 2011).

Desta forma, uma nova tecnologia com alta sensibilidade, baseada em hibridização *in situ* utilizando sondas de RNA (RNAscope®) foi desenvolvida. Esta técnica permite a identificação de RNAm de E6 e E7 através de reação em lâmina, utilizando tecido parafinizado que já é bem estabelecido na rotina clínica. As leituras das lâminas podem ser realizadas por microscopia ótica, preservando o contexto do tecido e permitindo visualizar a localização exata das oncoproteínas nas células infectadas (WANG, Fay et al., 2012). Essa é uma técnica pioneira no Brasil e na América Latina, e foi padronizada com o desenvolvimento deste trabalho no Laboratório de Patologia Molecular da Universidade Federal do Espírito Santo. Assim, este é o único laboratório da América Latina a executá-la e, portanto, é nesta técnica que consiste o ineditismo deste trabalho.

Em tumores da cavidade oral e orofaringe, até 2017, não havia indicadores ou marcadores prognósticos ou preditivos. Assim, a decisão terapêutica era baseada apenas no tamanho do tumor, presença de metástase em linfonodos regionais ou presença de metástase à distância, e não levando em conta fatores biológicos envolvidos. Com o novo estadiamento, os tumores da orofaringe foram classificados em duas categorias: p16-positivos e p16-negativos e, desta forma, a expressão de p16 foi adotada como determinante prognóstico. Para os tumores da cavidade oral e para os tumores de orofaringe p16-negativos ou para os quais não foi possível realizar a imuno-histoquímica do p16, foram adotados para a classificação a profundidade de invasão do tumor (DOI, do inglês *Depth of Invasion*) e o extravasamento extranodal (ENE, do inglês *Extranodal Extension*). Com a implementação do novo sistema de estadiamento se espera que haja melhor

rastreamento dos pacientes acometidos, já que ele reflete melhor o comportamento clínico e considera aspectos biológicos do tumor.

1.4 PROTEÍNA p16

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 efeito antiproliferativo 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 se torna 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 se ligar a esta proteína, induzindo a liberação do fator E2F, desencadeando o processo de replicação do DNA e aumentando a proliferação das células do epitélio infectado. O gene *CDKN2A*, por sua vez, tem sua expressão controlada por *feedback* negativo exercido pela pRB. Assim, a inativação de pRB por E7 resulta no acúmulo de p16 nas células infectadas. A oncoproteína viral E7 também é capaz de se ligar 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).

O gene supressor de tumor TP53 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, ativando mecanismos que induzem à apoptose. O gene P16INK4a, cuja

transcrição é ativada por p53, realiza a parada do ciclo celular, conforme descrito anteriormente. Assim, GADD45 pode então reparar o dano ao DNA e o gene BAX induzir apoptose nas células cujo dano ao DNA foi irreversível. A oncoproteína viral E6 se liga à p53, promovendo sua degradação proteassomal, causando instabilidade cromossomal, imortalização e proliferação anormal das células transformadas, favorecendo assim o desenvolvimento tumoral. Além disso, a oncoproteína E6 é capaz de degradar, em queratinócitos humanos, a proteína BAX, o que inibe a apoptose (FERRAZ et al., 2012; PANNONE et al., 2012).

A classificação TNM de tumores malignos, sistema de estadiamento estabelecido pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e utilizado para determinar o estadiamento clínico dos tumores de cabeça e pescoço e definir a terapêutica, vêm ganhando alguns indicadores de prognóstico, o que permite a estratificação de grupos de pacientes. A classificação TNM de tumores malignos lançou sua 8ª edição em 2017 e incluiu no estadiamento dos tumores da orofaringe a expressão de p16 como determinante prognóstico, o que indicaria, de forma indireta, presença de infecção por HPV, uma vez que há aumento da proteína p16 detectada por imuno-histoquímica. No entanto, o status do HPV por meio da proteína p16 está indicado apenas para câncer de orofaringe e, portanto, não inclui tumores da cavidade oral ou outros sítios da cabeça e pescoço (AMIN et al., 2017; BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2017).

Neste contexto, é primordial considerar a sensibilidade e a especificidade da técnica de imuno-histoquímica para avaliar a expressão de p16 como indicador da presença de infecção persistente por HPV. Assim, alguns estudos estimam que cerca de 20% dos tumores positivos para o p16 possam não ser positivos para o HPV e, talvez, a avaliação da expressão de p16 possa não ser suficiente para detectar infecção por HPV biologicamente relevante, ou mesmo confirmar a presença do HPV nesses tumores (MILLS et al., 2017; NAUTA et al., 2018). Além disso, estudos mostram não existir uma correlação absoluta entre a presença do HPV e o acúmulo de p16 (WENDT et al., 2013; ZARAVINOS, 2014). Portanto, aliada à expressão da proteína p16, ainda se faz necessário realizar a detecção de HPV transcricionalmente ativo nestes tumores.

1.5 RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGFR)

O EGFR (ou HER-1, ErbB1) é uma glicoproteína transmembranar (tirosina-quinase) de 170kDa, da família HER (ErbB). A família do EGFR é composta por 4 membros: EGFR (HER-1, ErbB1), ErbB2 (HER-2/neu), ErbB3 (HER-3) e ErbB4 (HER-4). Com exceção de HER-2, todos os membros dessa família apresentam ligantes conhecidos. O EGFR apresenta 6 ligantes conhecidos: EGF (fator de crescimento epidermal), TGF- α (fator de crescimento transformante alfa), EGF ligado à heparina, betacelulina, anfiregulina e epiregulina (BYEON; KU; YANG, 2019; FREITAS, 2008; NYATI et al., 2006).

Após ativação, esses receptores passam por homodimerização, heterodimerização com outros membros da família, ou até mesmo heterodimerização com outros receptores tirosina quinase (como MET ou IGF-1). Em seguida, ocorre uma transfosforilação nesses dímeros, que passam a transduzir sinais intracelulares. Quatro vias principais são afetadas com a ativação de EGFR: MAPK, relacionada à motilidade celular, ativação de expressão gênica e progressão do ciclo celular; PI3K/AKT/mTOR, relacionada à eventos como angiogênese, tumorigênese e inibição de apoptose; PLC γ /PKC, envolvida com transformação celular, diferenciação e apoptose; e a via JAK/STAT, relacionada à sobrevivência, proliferação e oncogênese. Desta forma, a ativação de EGFR interfere nos principais processos que levam à progressão de tumores malignos (BYEON; KU; YANG, 2019; FREITAS, 2008; NYATI et al., 2006; PERISANIDIS et al., 2013).

Como alternativas de tratamento tendo como alvo terapêutico o EGFR, existem duas classes de inibidores: as drogas baseadas em anticorpos monoclonais e os inibidores de tirosina quinase. O cetuximabe, anticorpo monoclonal da classe IgG1 anti-EGFR, foi a primeira terapia aprovada para o tratamento do câncer de cabeça e pescoço, sendo eficaz no tratamento de doença localmente ou regionalmente avançada e recorrente ou metastática. O mecanismo de ação do cetuximabe consiste na sua ligação ao domínio extracelular do EGFR, bloqueando a interação entre o ligante e o receptor, e desta forma não permitindo a dimerização do EGFR, sua ativação e todos os eventos que culminam na progressão do carcinoma

epidermoide de cabeça e pescoço (BYEON; KU; YANG, 2019; TABERNA; OLIVA; MESÍA, 2019) .

O EGFR se encontra diferencialmente expresso em vários tipos de câncer. Alguns estudos em cânceres de cabeça e pescoço mostram que EGFR é altamente expresso em tumores HPV-negativos, nos quais ocorre amplificação gênica. A fumaça do tabaco, um dos principais fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço, pode aumentar a produção de anfiregulina e TGF- α , dois ligantes já conhecidos do EGFR, o que resulta na ativação direta do receptor, com posterior ocorrência de todos os eventos relacionados à progressão tumoral e consequentemente, ao aumento da expressão de EGFR (BYEON; KU; YANG, 2019; CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015).

Já em tumores HPV-positivos podem ocorrer aberrações cromossômicas e mutação no gene do EGFR, ainda que em baixas taxas. Portanto, o esperado é que pacientes HPV-positivos tenham menor expressão de EGFR, e em contrapartida, que pacientes HPV-negativos expressem mais EGFR (BURTNES; BAUMAN; GALLOWAY, 2013; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018; CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015).

O estudo da expressão de EGFR em câncer de cabeça e pescoço se justifica não só pelo fato do principal tipo histológico desses tumores ser o carcinoma epidermoide, uma neoplasia de origem epitelial, mas o EGFR faz parte de uma rede regulatória existente no câncer de cabeça e pescoço (FENG et al., 2020). Observa-se uma superexpressão desse receptor em 34% a 80% dos casos. A superexpressão de EGFR tem sido significativamente associada com Sobrevida Global (SG) e Sobrevida livre de doença (SLD) reduzidas, resistência à radiação e ao tratamento quimioterápico, falha do tratamento local, recidivas em nódulos cervicais e aumento de metástases à distância, o que resulta em um pior prognóstico em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (BECK et al., 2016; BYEON; KU; YANG, 2019; CHOI et al., 2016; COLOMBO; RAHAL, 2008; FREITAS, 2008; KUMAR et al., 2008).

Desta forma, a adoção de uma avaliação prévia da expressão de EFGR no momento do diagnóstico poderia beneficiar pacientes com maior risco de

metástases, como os pacientes com doença local avançada, podendo trazer benefícios para a qualidade de vida do paciente.

Além disso, adicionar biomarcadores de prognóstico e até mesmo a combinação, como já ocorre na estratificação feita no câncer de mama, pode refinar ainda mais a seleção dos pacientes, direcionar tratamentos, o que reflete na sobrevida e na qualidade de vida dos indivíduos. Portanto, este estudo objetiva avaliar a aplicabilidade da infecção por HPV de alto risco aliada a uma detecção com maior sensibilidade, onde casos falso HPV-negativo poderiam justificar casos em que a expressão de p16 não reflete a associação com HPV; e a aplicabilidade da expressão das proteínas p16 e EGFR como formas de melhorar a seleção e adequar a conduta clínica para os pacientes com CE oral e orofaríngeo.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a aplicabilidade dos biomarcadores HR-HPV, p16 e EGFR como indicadores de prognóstico e resposta ao tratamento em CE oral e orofaríngeo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a prevalência de CE oral e orofaríngeo associados a HR-HPV;
- Avaliar a imuno-expressão de p16 e EGFR em CE oral e orofaríngeo;
- Investigar a utilização da expressão de p16 como indicador da infecção pelo HPV em CE oral e orofaríngeo;
- Verificar a correlação entre a expressão de EGFR e a infecção pelo HPV;
- Investigar a aplicabilidade dos marcadores HR-HPV, EGFR e p16 como indicadores de prognóstico em CE oral e orofaríngeo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 AMOSTRAGEM

Amostras e dados clínicos foram provenientes de pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral e orofaringe recrutados em dois estudos multicêntricos internacionais com desenho observacional longitudinal prospectivo e analítico: *Study of Head and Neck Cancer in South America (InterCHANGE)*, coordenado pela International Agency for Research on Cancer (França), realizado em colaboração com o Hospital Santa Rita de Cássia e Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, Espírito Santo, Brasil; e *Improving treatment selection using Predictive Classifiers of Treatment Response for Head and Neck Cancers and dysplasia (PREDICT)*, coordenado pela University Hospitals Coventry & Warwickshire, Reino Unido. Estes estudos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde - Processo 318/2011 e pelo NRES Committee West Midlands – Coventry & Warwickshire - EC.10.H1210.9, conforme Anexos A, B e C. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para participarem desta pesquisa. A obtenção das amostras, tipo de amostra utilizado e seu destino quanto às técnicas adotadas está esquematizado na figura 6.

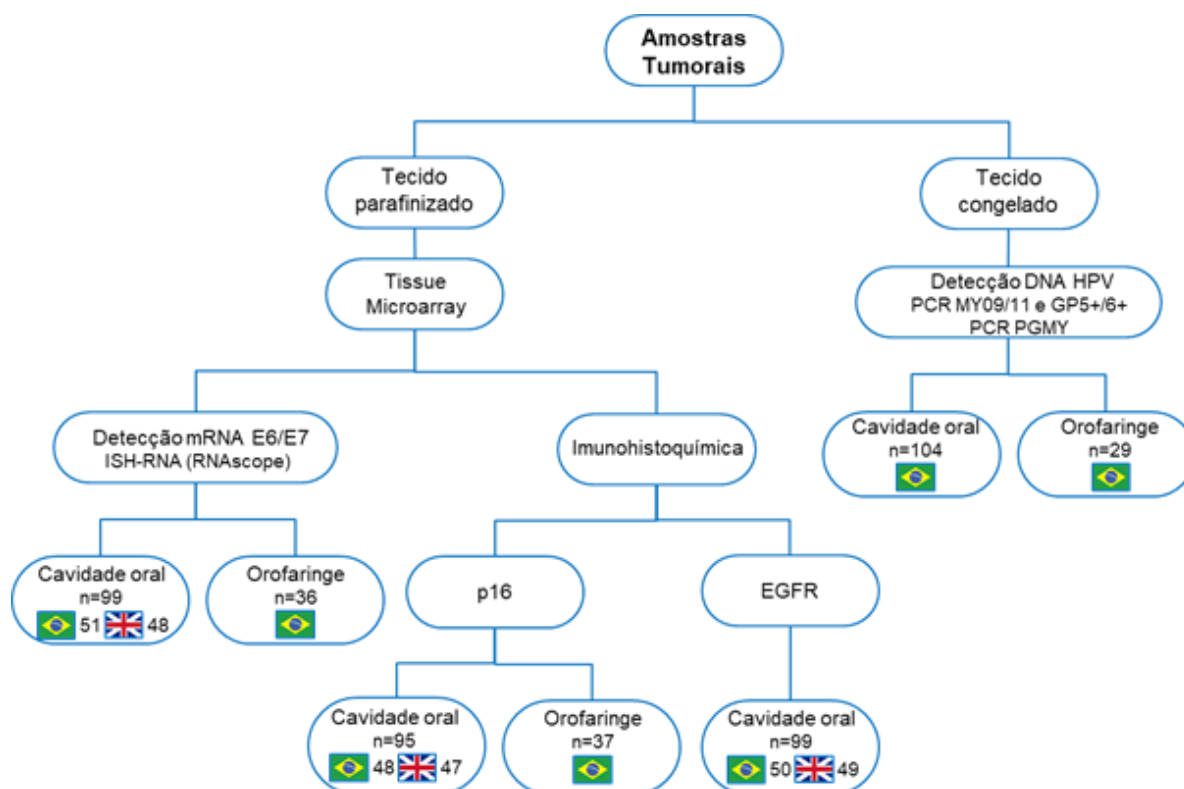


Figura 6. Tipos de amostra utilizados, origem e distribuição de acordo com cada técnica adotada.

Como critérios de inclusão foram considerados: amostras provenientes de indivíduos de ambos os gêneros, grupos étnicos ou faixa etária, com diagnóstico conclusivo de CE oral e orofaríngeo primário; lâminas histopatológicas, material incluído em parafina em bom estado de conservação e amostras de tumores a fresco. Foram excluídos pacientes que realizaram tratamento antineoplásico prévio ou aqueles com seguimento clínico inferior a 24 meses. As variáveis clínicas analisadas foram: tamanho da lesão primária (T); comprometimento linfonodal (N), confirmada microscopicamente; localização da lesão primária.

Os pacientes foram acompanhados por no mínimo 24 meses e no máximo 60 meses. Após entrevista inicial, ao confirmar o diagnóstico, os pacientes foram acompanhados em 4 momentos: em um período entre 6 a 18 meses após a primeira entrevista (1); entre 6 a 18 meses após o primeiro seguimento (2); 30 meses após a entrevista inicial (3); e 60 meses após a entrevista inicial (4).

Durante o seguimento, foram coletados dados sobre histórico de consumo de álcool e tabaco, dados referentes à progressão da doença, remissão, recidiva regional e à

distância, além de informações do estado vital do paciente. Foram considerados ex-tabagistas e ex-etilistas indivíduos que não possuíam histórico de consumo de tabaco e álcool, respectivamente, por no mínimo 12 meses. Todos os dados referentes as características clínicas da doença e hábitos de vida do paciente foram obtidos por meio de entrevista, consulta médica ou busca ativa em prontuários.

3.2 MICROARRANJO TECIDUAL (*TISSUE MICROARRAY - TMA*)

Os microarranjos teciduais (do inglês *Tissue microarray*, TMA) foram preparados a partir de blocos de tecidos incluídos em parafina, como previamente descrito (PARSONS; GRABSCH, 2009).

A construção dos TMAs de tecidos provenientes da cavidade oral foi realizada no The Nottingham Health Science Biobank, localizado no Reino Unido. As lâminas coradas em HE foram digitalizadas na plataforma Panoramic digital slide scanner (3DHISTECH®, Budapeste, Hungria) e avaliadas pelo sistema de análise de imagens Panoramic Viewer software (versão 1.15 3DHISTECH®, Budapeste, Hungria). Áreas de amostras de tecido representativas do tumor (frente de invasão e porção mediana), displasia e epitélio adjacente ao tumor identificadas foram então selecionadas utilizando a ferramenta para confecção do TMA.

Os blocos correspondentes às lâminas selecionadas, denominados blocos doadores, foram digitalizados pelo equipamento TMA Master II (3DHISTECH®, Budapeste, Hungria). As imagens geradas do escaneamento das lâminas, com as áreas previamente selecionadas para confecção do TMA, foram alinhadas às imagens fornecidas pelo escaneamento dos blocos. A partir do alinhamento entre as imagens das lâminas e de seus respectivos blocos, fragmentos cilíndricos de 0,6 mm foram obtidos dos blocos doadores e inseridos em um bloco inicialmente vazio, chamado bloco receptor. Esta transferência de tecidos de regiões selecionadas para o bloco receptor ocorreu de forma automatizada, em locais previamente definidos em uma matriz previamente construída, utilizando o equipamento TMA Master II. Para cada caso e região selecionada (epitélio adjacente ao tumor, displasia, frente tumoral e porção mediana) as amostras foram alocadas em triplicata.

A construção dos TMAs contendo amostras de CE orofaríngeo foram realizadas no AC Camargo Cancer Center, São Paulo. Após seleção das áreas tumorais e marcação das áreas em lâminas de HE de forma manual, fragmentos cilíndricos de 1,0 mm foram obtidos dos blocos doadores e inseridos em um bloco receptor. Esta transferência de tecidos de regiões selecionadas para o bloco receptor se deu de forma manual, utilizando o equipamento Manual Tissue Arrayer – MTA1 (Estigen ÖU, Tartu, Estônia). Para cada caso a ser analisado, as amostras foram dispostas em triplicata no bloco receptor.

Posterior à construção dos TMAs, os blocos receptores foram seccionados em um micrótomo para a obtenção de cortes histológicos sequenciais de 3 µm de espessura, dispostos em lâminas polarizadas (StarFrost® Advanced Polycat, Braunschweig, Alemanha).

Para a validação do uso de imuno-histoquímica em TMA foram utilizadas 10 lâminas convencionais contendo tecido tumoral de CE oral e orofaríngeo imunomarcadas com p16, 10 lâminas com EGFR e 10 lâminas submetidas à hibridização *in situ* nas quais as avaliações de expressão das proteínas e positividade para o HPV foram realizadas por dois patologistas de forma independente. Foi utilizada a análise de concordância Kappa para avaliar a concordância entre os observadores nos parâmetros analisados, sendo considerado aceitável um nível de concordância maior ou igual a 80%. Não houve diferença significativa entre as leituras realizadas. Em seguida, foi realizada a leitura dos mesmos casos no TMA e avaliada a concordância entre os dois observadores nos parâmetros analisados. Novamente não houve diferença significativa entre as leituras, conforme a análise de concordância Kappa. Por fim, a leitura feita em lâmina convencional foi comparada com o TMA, nos mesmos casos e utilizando as mesmas análises, não sendo observada diferença significativa entre as leituras efetuadas em lâminas convencionais e lâminas de TMA. Após validação do método, a utilização do TMA foi adotada pelas vantagens que possui em relação à uniformização das reações, economia de tempo empregado e otimização do uso de anticorpos, sondas, reagentes e tecidos.

3.3 DETECÇÃO DE HPV

3.3.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.3.1.1 Extração de DNA e Avaliação da Viabilidade da Amostra

Fragmentos de tecido tumoral foram obtidos por meio de biópsia ou de ressecção cirúrgica do tumor. Os fragmentos foram acondicionados em recipientes esterilizados, não se excedendo 30 minutos após a excisão, e armazenados em microtubos contendo RNAlater®. As amostras foram enviadas ao Laboratório de Patologia Molecular da UFES e os tecidos tumorais foram mantidos 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 CE oral e orofaríngeo congelado a -80 °C foi obtido através da degradação mecânica de um fragmento do tecido, digestão com Proteinase K e Dodecil Sulfato de Sódio incubado à 60 °C por 2 dias, seguido de extração com clorofórmio e fenol e precipitação com etanol. O material foi ressuspendido em Tris-EDTA

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 por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com 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. O tamanho esperado para o fragmento referente ao gene da β -globina foi de 509 pb. 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.

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

Foram utilizados os oligonucleotídeos 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 se utilizando o par de oligonucleotídeos MY09/11. As condições reacionais usadas 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, que deu origem a fragmentos de 450 pb. O produto obtido desta reação foi submetido à amplificação utilizando o par de oligonucleotídeos 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, originando fragmentos de 150 pb.

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.

3.3.1.3 PCR PGMY09/11

Com a finalidade de validar e confirmar os dados obtidos com a amplificação por oligonucleotídeos degenerados, a amplificação por PCR utilizando o conjunto de oligonucleotídeos PGMY09/11 (Invitrogen, Life Technologies) foi realizada nas

amostras de DNA tumoral que já foram submetidas à PCR com os oligonucleotídeos MY09/11 e GP5+/6+. O conjunto de oligonucleotídeos PGMY09/11 consiste em uma mistura de 18 oligonucleotídeos, o que possibilita 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 oligonucleotídeos PGMY09/11 apresenta maior sensibilidade em relação ao MY09/11, tendo sido desenvolvido para melhorar o consenso na literatura (GRAVITT et al., 2000). Todos os oligonucleotídeos 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. O produto final desta reação contém os fragmentos do DNA viral de 450 pb.

Os produtos desta reação foram então submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, corados com 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.

Tabela 2. Mistura para as PCR realizadas para detecção de HPV

Reagentes da mistura para PCR	Concentração/Volume = (25 µL reação)			
	β-globina	MY09/11	GP5+/6+	PGMY09/11
DNTP	200mM	200mM	200mM	200mM
MgCl ₂ (50 mM)	1,5mM	6mM	3,5mM	4 mM
Oligonucleotídeos	50pmol	50pmol	50pmol	10pmol
Taq Polimerase	1U	7,5U	7,5U	7,5U
DNA (amostra)	5 µL	3 µL	3 µL	5 µL
Tamanho de fragmento gerado	509pb	450pb	150pb	450pb

3.3.1.4 Sequenciamento

Para validar os resultados positivos obtidos nas amplificações realizadas, os produtos de PCR 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 se obter a sequência do DNA viral e assim conhecer o tipo de HPV envolvido na infecção.

3.3.2 Hibridização *in situ* – RNA

A técnica de hibridização *in situ* foi realizada para detecção de RNA mensageiro (RNAm) das oncoproteínas E6/E7 do HR-HPV utilizando os TMAs previamente preparados. Para execução da técnica foi utilizado o kit HR-HPV RNAscope® (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, Califórnia, EUA) como previamente descrito (UKPO et al., 2011), conforme instruções do fabricante.

Com a utilização da técnica RNAscope®, as sondas “duplo-Z”, que são duas sondas independentes, devem se hibridizar na sequência alvo e, apenas se as duas sondas se hibridizarem lado a lado, a amplificação do sinal pode ocorrer, através da adição de amplificadores à reação. A especificidade da reação se dá justamente pela baixa probabilidade das duas sondas independentes se hibridizarem lado a lado com um alvo não específico. Devido à alta especificidade e à amplificação do sinal, uma única molécula de RNAm é capaz de ser visualizada em lâmina. A sequência da reação pode ser visualizada na Figura 7.

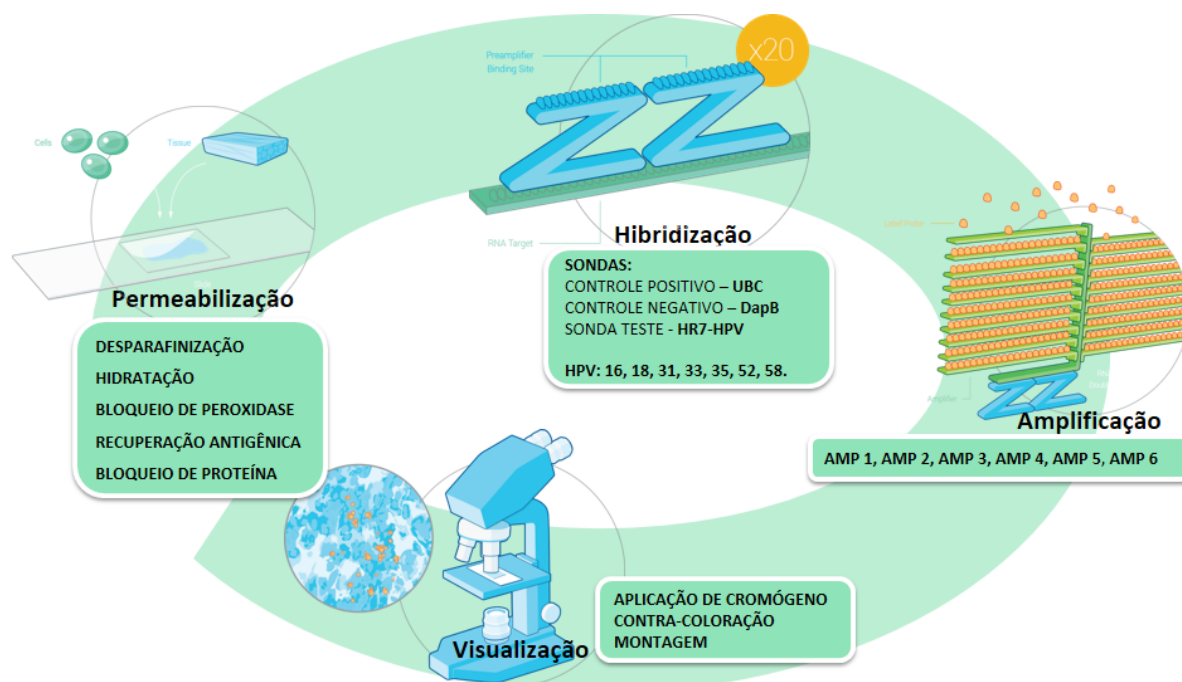


Figura 7 Sequência de etapas para a hibridização *in situ* utilizando sondas de RNA. Adaptado de: ACD - Advanced Cell Diagnostics Inc.

Neste experimento, secções de TMA com 4µm de espessura foram desparafinizadas em estufa a 60°C por 1 hora, seguida de imersões sucessivas em xilol e etanol em diferentes concentrações. Em seguida, foram pré-tratadas por meio do bloqueio de peroxidase endógena à temperatura ambiente por 10 minutos, seguido de lavagem em água destilada, recuperação antigênica com RNAscope® Target Retrieval em temperatura de 98 – 102 °C por 15 minutos, com posterior resfriamento em água destilada e aplicação de Protease Plus® para bloqueio de proteínas a 40 °C por 30 minutos. Após, as lâminas foram lavadas em água destilada e em seguida foi realizada a hibridização com sondas sítio-específicas para os genes E6 e E7 de 7 genótipos de HR-HPV (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -52 e -58). Foram utilizados como controle positivo e negativo da reação, respectivamente, sondas de Ubiquitina C (UBC, um gene endógeno constitutivamente expresso) e sondas DapB (gene bacteriano). Todas as lâminas foram incubadas em forno de hibridização por 2 horas a 40 °C, seguida de aplicação de tampão de lavagem. A partir da ligação da sonda duplo Z, o sinal é amplificado através da adição de reagentes amplificadores (Amp1, Amp2, Amp 3, Amp 4, Amp 5 e Amp 6). Desta forma, foram aplicados: Amp 1, por 30 minutos à 40 °C; Amp 2, por 15 minutos à 40 °C; Amp 3, por 30 minutos à 40 °C;

Amp 4, por 15 minutos à 40 °C; Amp 5, por 30 minutos à temperatura ambiente; e Amp 6, por 15 minutos à temperatura ambiente. Foi realizada a lavagem das lâminas ao final das aplicações de cada amplificador. Por fim, foi realizada a detecção dos sinais com os reagentes Brown-A® e Brown-B®, seguido de DAB, contra-coloração com hematoxilina de Gill e montagem a partir de incubação em sequências crescentes de etanol, imersão em xilol e finalmente aplicação de Entelan® e lamínula.

3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para análise de expressão das proteínas EGFR e p16 em tumores da cavidade oral e análise da expressão de p16 em tumores da orofaringe, lâminas com TMA seccionadas com 4µm de espessura foram desparafinizadas com xilol e re-hidratadas 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, para bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos. A seguir os espécimes foram lavados com tampão Tris-SDS (TBS) por 5 minutos, com posterior bloqueio de proteínas (Protein Block, Novolink™ – Novocastra™) por 5 minutos. Após lavagem com TBS por 5 minutos, as lâminas foram incubadas a 4°C overnight com os anticorpos primários: anti-EGFR humano (clone 528, Santa Cruz, diluição 1:100) e anti-p16 humano (clone E6H4, Ventana Medical Systems, 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 com TBS. Aplicou-se em seguida o polímero (Novolink™ Polymer - Novocastra™) e as lâminas foram incubadas novamente por 30 minutos e lavadas 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®), recobertas com lamínula e montadas em meio de montagem (Entelan® - Merck Millipore).

Controles negativos foram obtidos pela omissão dos anticorpos primários, que foram substituídos por PBS-BSA 1% e soro não imune de camundongo. Uma amostra de CE orofaríngeo com alta expressão de p16 foi utilizada como controle positivo de p16, e a marcação da camada basal de epitélio oral normal foi utilizada como controle positivo de EGFR.

A expressão de p16 foi classificada como positiva na presença de coloração forte e difusa, tanto nuclear quanto citoplasmática; enquanto EGFR foi considerado apenas marcação membranar. 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.

A expressão de p16 e EGFR foi avaliada utilizando o H-Score, que 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 et al., 2012).

Para definir o *cut-off* utilizado para categorizar a alta e baixa expressão das proteínas estudadas, foi adotado, para a proteína p16, os valores estabelecidos por Jordan e colaboradores (2012). Esses autores utilizaram a curva ROC (Curva Característica de Operação do Receptor, do inglês Receiver Operating Characteristic Curve) para determinar sensibilidade e especificidade, onde 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 é representado pela expressão de E6 e E7. Para a expressão de EGFR foi utilizado como ponto de corte o valor da mediana dos scores obtidos.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes de Qui-quadrado ou exato de Fisher e regressão logística múltipla foram utilizados para associar variáveis clinicopatológicas, fatores de risco e características prognósticas entre os grupos: HPV-positivos e HPV-negativos; alta e baixa expressão de EGFR; e alta e baixa expressão de p16.

A correlação de Spearman foi utilizada para avaliar a existência de correlação entre expressão de p16 e infecção por HPV, bem como avaliar a força e direção dessa correlação.

Sobrevida global e sobrevida livre de doença foram calculadas utilizando teste de Kaplan-Meier, com teste de Log-Rank para comparação das curvas geradas. Para análise da sobrevida global (SG) foram consideradas as datas do óbito versus a duração da sobrevida total. 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 SG e SLD todos os casos em que o evento de interesse ocorreu (óbito, para a SG e recorrência, para a SLD). Os casos em que os eventos não ocorreram até a data da última informação objetiva do acompanhamento foram classificados como “censurados”.

A análise estatística foi feita se utilizando o software SPSS (Statistic Package for Social Sciences) versão 20.0. Foi adotado nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Com as amostras de tecido tumoral parafinizado e congelado, foi possível realizar as técnicas de detecção de HPV e imuno-histoquímicas. Para que houvesse uniformidade nas análises e considerando que, embora haja proximidade anatômica, cavidade oral e orofaringe são sítios anatômicos completamente distintos, as análises foram realizadas separadamente.

As amostras utilizadas no estudo foram predominantemente do sexo masculino, provenientes de pacientes com hábitos tabagistas e etilistas, com estadiamento clínico avançado. Quanto à imunohistoquímica, grande parte das amostras revelaram alta expressão de EGFR e ausência de expressão de p16.

No grupo da cavidade oral originada de tecido parafinizado, as amostras do Brasil e do Reino Unido apresentaram algumas particularidades: quanto aos desfechos óbito e recidiva, as maiores porcentagens foram encontradas no Brasil, assim como tumores com maiores dimensões e o estadiamento clínico avançado.

A caracterização das amostras de acordo com o tipo de amostra utilizado, localização geográfica e sítio anatômico estudado encontram-se detalhadas na tabela 3.

Tabela 3. Caracterização da amostra, de acordo com o tipo de amostra e o sítio anatômico estudados (*continua*).

Variáveis		Tecido Parafinizado (n=149)						Tecido Congelado (n=133)			
		Cavidade oral				Orofaringe		Cavidade oral		Orofaringe	
		Brasil (n=57)		Reino Unido (n=52)		Brasil (n=40)		Brasil (n=104)		Brasil (n=29)	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Sexo	Masculino	49	85.96	36	69.23	37	92.50	81	77.88	28	96.55
	Feminino	8	14.04	16	30.77	3	7.50	23	22.12	1	3.45
Tabagismo	Sim	46	92.00	18	66.67	38	95.00	72	72.00	27	100.00
	Não	4	8.00	9	33.33	2	5.00	28	28.00	0	0.00
Etilismo	Sim	37	66.07	15	75.00	38	95.00	85	85.00	27	100.00
	Não	19	33.93	5	25.00	2	5.00	15	15.00	0	0.00
Óbito	Sim	35	61.40	18	35.29	28	70.00	18	69.23	8	50.00
	Não	22	38.60	33	64.71	12	30.00	8	30.77	8	50.00
Recidiva	Sim	24	42.11	11	21.57	7	17.50	12	50.00	4	25.00
	Não	33	57.89	40	78.43	33	82.50	12	50.00	12	75.00
Tamanho do Tumor	T1/T2	14	24.56	41	82.00	15	37.50	42	42.00	13	46.43
	T3/T4	43	75.44	9	18.00	25	62.50	56	56.00	15	53.57
Metástase em Linfonodo	N0	27	47.37	27	64.29	16	40.00	56	56.00	28	100.00
	N+	29	50.88	15	35.71	24	60.00	42	42.00	0	0.00

Tabela 3. Caracterização da amostra, de acordo com o tipo de amostra e o sítio anatômico estudados (*continuação*).

Variáveis		Tecido Parafinizado (n=149)						Tecido Congelado (n=133)			
		Cavidade oral				Orofaringe		Cavidade oral		Orofaringe	
		Brasil (n=57)		Reino Unido (n=52)		Brasil (n=40)		Brasil (n=104)		Brasil (n=29)	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Estadiamento Clínico	I/II	9	15.79	27	61.36	8	20.00	33	33.33	7	25.00
	III/IV	48	84.21	17	38.64	32	80.00	66	66.67	21	75.00
HPV status^a	positivo	5	9.80	3	6.25	4	11.11	3	2.88	0	0.00
	negativo	46	90.20	45	93.75	32	88.89	101	97.12	29	100.00
p16	ausência	28	58.33	32	68.09	23	65.71				
	baixa expressão	13	27.08	9	19.15	6	17.14				
	alta expressão	7	14.58	6	12.77	8	22.86				
EGFR	ausência	17	34.00	18	36.73						
	baixa expressão	9	18.00	11	22.45						
	alta expressão	24	48.00	20	40.82						
Idade	Mediana		58		64		55		59		58
	Média		58.86		62.27		55.48		59.05		57.41
	Desvio Padrão		11.92		13.09		10.61		12.40		7.47

^a Detecção por ISH-RNA em tecido parafinizado e detecção por PCR em tecido congelado.

Algumas variáveis apresentam dados incompletos.

4.1 DETECÇÃO DE HPV – REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE

DNA genômico de alto peso molecular extraído de 133 amostras de CE oral e orofaríngeo, armazenado a -80°C, foram analisados pela técnica de PCR. Os resultados da detecção por PCR foram obtidos por PCR utilizando os oligonucleotídeos MY09/11 seguido da nested GP5+/6+ e PCR utilizando uma mistura de oligonucleotídeos PGMY. Das 133 amostras analisadas, 3 foram positivas para o DNA de HPV, o que indica uma frequência de 2,25%. De acordo com o sequenciamento realizado, todas as amostras positivas apresentaram o HPV-16. As amostras positivas eram provenientes da cavidade oral, 2 de indivíduos do sexo masculino e 1 do sexo feminino, maioria tabagista e etilista, todos com estadiamento avançado (III e IV). Como esses pacientes com tumores HPV-positivos eram perdidos de seguimento, não foi possível calcular SG e SLD. Não foi encontrada associação entre a infecção por HPV e as variáveis clínicas e fatores de risco nestes pacientes. Os dados provenientes das análises realizadas encontram-se sumarizados na tabela 4.

Tabela 4. Associação entre a infecção por HPV e as variáveis clínicas e fatores de risco tabagismo e etilismo em carcinoma epidermóide oral e orofaríngeo.

Variáveis Clínicas		HPV status (n=133)				p
		Negativo	(%)	Positivo	(%)	
Sexo	Masculino	107	98.17	2	1.92	0.452
	Feminino	23	95.83	1	4.17	
Sítio Anatômico	Cavidade Oral	101	97.12	3	2.88	1.000
	Orofaringe	29	100.00	0	0.00	
Tamanho do Tumor	T1/T2	55	100.00	0	0.00	0.256
	T3/T4	68	95.77	3	4.23	
Metástase em Linfonodo	N0	70	100.00	0	0.00	0.085
	N+	53	94.64	3	5.36	
Estadiamento Clínico	I/II	40	100.00	0	0.00	0.551
	III/IV	84	96.55	3	3.45	
Tabagismo	Sim/Ex	97	97.98	2	2.02	0.530
	Não	27	96.43	1	3.57	
Etilismo	Sim	110	98.21	2	1.79	0.316
	Não	14	93.33	1	6.67	

Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, $p < 0,05$.

Algumas variáveis apresentam dados incompletos.

O resultado preliminar dessa análise, incluindo apenas tumores da cavidade oral (n=90), foi publicado em 2018 no periódico BMC Cancer e poderá ser visualizado com maiores detalhes no item 4.4.1 desta tese.

4.2 DETECÇÃO DE HPV – HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*-RNA

A hibridização *in situ* utilizando sondas de RNA para detecção de HPV foi realizada em 99 amostras de CE oral, com 8 tumores HPV-positivos, o que representa uma frequência de 8,08%. Já em CE orofaríngeo, das 40 amostras analisadas, 4 eram HPV-positivo, com frequência de 10%. Comparado ao resultado total à detecção de

HPV por PCR, em tumores da cavidade oral e orofaringe, a detecção aumentou em 4x utilizando a ISH-RNA.

Neste estudo, avaliando a associação entre as características clinicopatológicas, fatores de risco, expressão de p16 e EGFR e a presença do HPV, foi observada associação entre a expressão de p16 e a infecção por HPV em CE oral, indicando que pacientes com tumores HPV-negativo foram encontrados com maior frequência no grupo p16-negativo. Em orofaringe não foi possível ter esta constatação, já que foram encontrados 4 tumores HPV-positivo, com metade deles p16-positivo e a outra metade p16-negativo. Da mesma forma, a alta expressão de EGFR não foi capaz de prever a ausência de infecção por HPV em tumores da cavidade oral, conforme hipotetizado neste estudo. Não houve associação entre as demais variáveis analisadas, conforme detalhado na Tabela 5.

Para avaliar alguma possível influência entre hábitos tabagistas e etilistas e a expressão de EGFR e p16 em tumores HPV-negativos da cavidade oral, foi realizada uma análise complementar removendo as amostras HPV-positivas. Porém, não foi encontrada associação entre as variáveis analisadas. Os dados desta análise encontram-se na Tabela 6.

Dados sobre a detecção de RNAm E6/E7 do HPV por ISH em CE oral (n = 99) foi submetido à revista *Archives of Oral Biology*, o que se encontra detalhado no item 4.4.2 desta tese.

Em 39 amostras tumorais foi possível executar as detecções de DNA de HPV por PCR e RNAm E6/E7 por ISH, sendo 24 provenientes de CE oral e 15 de CE orofaríngeo. Em cavidade oral, 2 amostras apresentaram resultado negativo na PCR, mas positivo na ISH; já em orofaringe, 1 amostra foi negativa utilizando a PCR, mas positiva na ISH. As demais foram negativas em ambas as técnicas.

Seguindo as regras do novo Sistema TNM de Classificação das Neoplasias Malignas (AMIN et al., 2017), que adicionou o p16 como fator prognóstico para o câncer de orofaringe, foi realizada a análise de sobrevida neste estudo, porém não foram encontradas diferenças entre as curvas de sobrevida para pacientes com tumores p16 positivos x p16 negativos. Desta forma, e considerando os estudos que dizem que não há uma correlação absoluta entre a expressão de p16 e HPV, foi

realizada também a análise da SG e SLD com os pacientes cujas amostras foram submetidas à detecção de RNAm E6/E7 HPV por ISH para avaliar se os pacientes HPV-positivos apresentam melhor sobrevida que os pacientes HPV-negativos em orofaringe. O tempo médio de SG encontrado foi de 22,5 meses para os pacientes com tumores HPV-negativos e de 39,5 para os pacientes com tumores HPV-positivos. Apesar de os pacientes HPV-positivos terem apresentado maior tempo médio de SG, essa diferença não foi significativa ($p=0,340$). O tempo médio de SLD encontrado foi de 44,4 meses para os pacientes HPV-negativos e 24,4 para os pacientes HPV-positivos, e não houve diferença entre os grupos ($p=0,810$). As curvas de SG e SLD relacionadas ao status HPV estão disponibilizadas na Figura 8.

Tabela 5. Detecção de RNAm E6/E7 HPV por Hibridização in situ em carcinoma epidermoide oral e orofaríngeo, e sua associação com as variáveis clínicas, fatores de risco e expressão de p16 e EGFR, avaliadas por sítio anatômico (*continua*).

Variáveis clínicas		RNAm E6/E7 HPV				p	RNAm E6/E7 HPV				p
		Cavidade Oral					Orofaringe				
		Neg	(%)	Pos	(%)		Neg	(%)	Pos	(%)	
Sexo	Masculino	71	92.2	06	7.8	1.000	29	87.9	04	12.1	1.000
	Feminino	20	90.9	02	9.1		03	100.0	0	0.0	
Idade	Até 60 anos	49	94.2	03	5.8	0.472	23	92.0	02	8.0	0.570
	Acima de 60 anos	42	89.4	05	10.6		09	81.8	02	18.2	
Sítio Anatômico	Língua	66	91.7	06	8.3	0.870	-	-	-	-	0.860
	Assoalho	08	88.9	01	11.1		-	-	-	-	
	Cavidade oral SOE**	17	94.4	01	5.6		-	-	-	-	
	Tonsila	-	-	-	-	12	92.3	01	7.7		
	Base de língua	-	-	-	-	12	85.7	02	14.3		
	Palato mole	-	-	-	-	08	88.9	01	11.1		
Tamanho do Tumor	T1/2	47	90.4	05	9.6	0.721	10	90.9	01	9.1	1.000
	T3/4	42	93.3	03	6.7		22	88.0	03	12.0	
Metástase linfonodal	N0	45	91.8	04	8.2	1.000	22	95.7	01	4.3	0.124
	N+	36	90.0	04	10.0		10	76.9	03	23.1	
Estadiamento	I/II	32	91.4	03	8.6	1.000	04	80.0	01	20.0	0.466
	III/IV	52	91.2	05	8.8		28	90.3	03	9.7	
Tabagismo	Sim/Ex	58	90.6	06	9.4	0.582	31	91.2	03	8.8	0.213
	Não	13	100.0	0	0.0		01	50.0	01	50.0	
Consumo de tabaco (incluindo não fumantes)	< 20/dia	35	89.7	04	10.3	0.641	28	87.5	04	12.5	1.000
	≥ 20/dia	26	96.3	01	3.7		04	100.0	0	0.0	

Tabela 5. Detecção de RNAm E6/E7 HPV por Hibridização in situ em carcinoma epidermoide oral e orofaríngeo, e sua associação com as variáveis clínicas, fatores de risco e expressão de p16 e EGFR, avaliadas por sítio anatômico (*continuação*).

Variáveis clínicas		RNAm E6/E7 HPV Cavidade Oral				p	RNAm E6/E7 HPV Orofaringe				p
		Neg	(%)	Pos	(%)		Neg	(%)	Pos	(%)	
Etilismo	Sim	42	89.4	05	10.6	0.660	31	91.2	03	8.8	0.213
	Não	19	95.0	01	1.8		01	50.0	01	50.0	
p16	Baixa	75	94.9	04	5.1	0.046*	24	92.3	02	7.7	0.268
	Alta	09	75.0	03	25.0		07	77.8	02	22.2	
EGFR	Baixa	49	92.5	04	7.5	1.000	-	-	-	-	
	Alta	39	92.9	03	7.1		-	-	-	-	

Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher. *p < 0,05

**SOE; sem outra especificação

Tabela 6. Associação entre expressão de p16 e EGFR com fatores de risco em carcinoma epidermoide da cavidade oral HPV-negativos.

Variáveis		HPV-Negativos (n=91)									
		p16				p	EGFR				p
		baixa	(%)	alta	(%)		baixa	(%)	alta	(%)	
Tabagismo	Sim	46	88.46	6	11.54	0.655	35	62.50	21	37.50	0.106
	Não	11	84.62	2	15.38		4	33.33	8	66.67	
Consumo de tabaco (incluindo não fumantes)	≤ 20/dia	27	84.38	5	15.63	0.686	15	46.88	17	53.13	0.191
	> 20/dia	21	91.30	2	8.70		17	65.38	9	34.62	
Etilismo	Sim	34	87.18	5	12.82	0.306	26	63.41	15	36.59	0.559
	Não	16	100.00	0	0.00		9	52.94	8	47.06	

Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, $p < 0,05$.

Algumas variáveis apresentam dados incompletos.

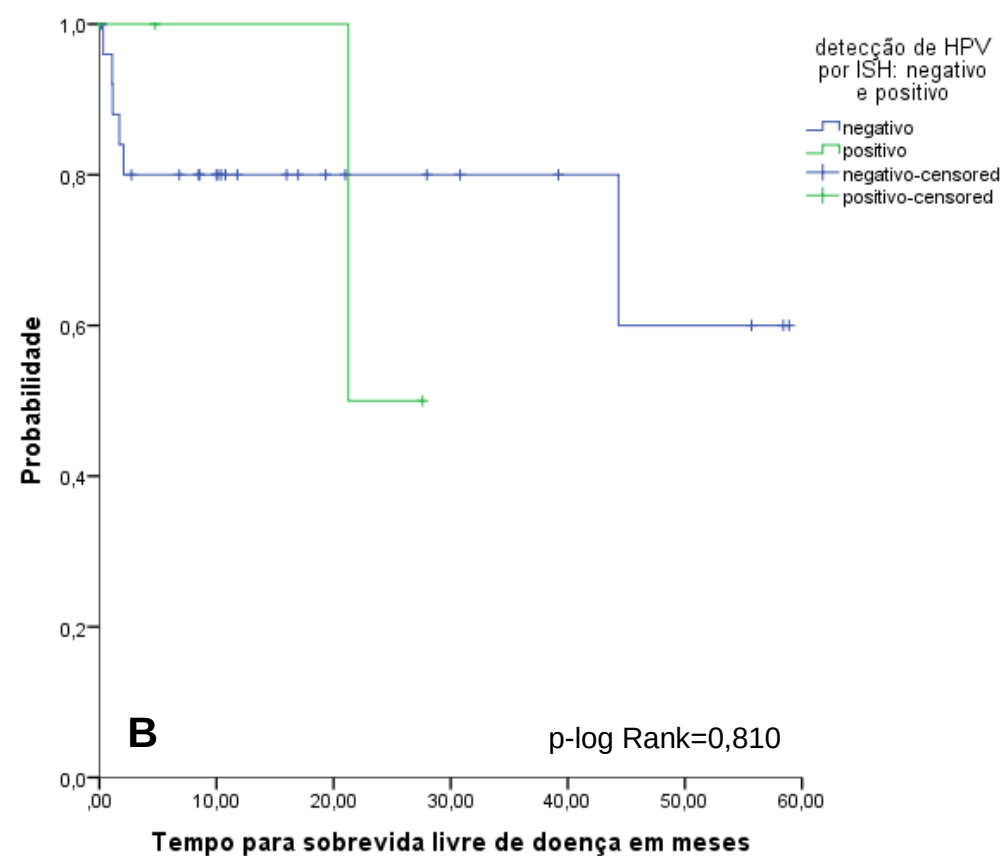
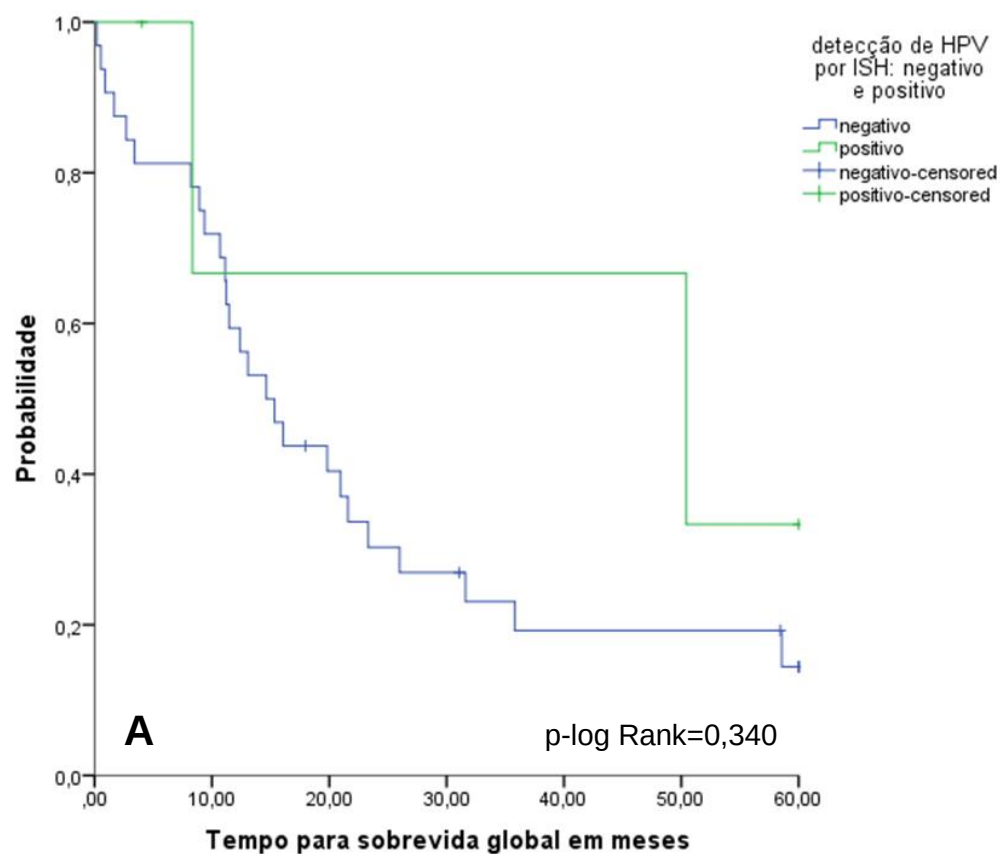


Figura 8. Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) em 60 meses associada à infecção por HPV em orofaringe. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados

Avaliando a correlação entre a expressão de p16 e a infecção por HPV em amostras de CE oral e orofaríngeo, foi observada a presença de correlação crescente e significativa entre p16 e HPV ($p=0,007$), o que indica que a correlação entre p16-negativo e HPV-negativo existe, assim como entre p16-positivo e HPV-positivo. Porém foi detectada uma correlação fraca entre as duas variáveis ($r_s=0,239$).

Com base no estudo de Ang e Colaboradores (2010), os pacientes com CE orofaríngeo foram estratificados em grupos de risco, considerando o status HPV (RNAm E6/E7 HPV por ISH), número de cigarros consumidos por dia, tamanho do tumor e comprometimento linfonodal. Os grupos de risco propostos foram estratificados da seguinte forma:

- Baixo risco:
 - Pacientes HPV-positivos, que consomem até 20 cigarros por dia (incluindo não fumantes);
 - Pacientes HPV-positivos, que consomem mais de 20 cigarros por dia, com N0-N2a;
 - Pacientes HPV-negativos, que consomem até 20 cigarros por dia (incluindo não fumantes), T1.
- Risco intermediário:
 - Pacientes HPV-positivos, que consomem mais de 20 cigarros por dia, N2b-N3;
 - Pacientes HPV-negativos, que consomem até 20 cigarros por dia (incluindo não fumantes), T2-T3.
- Alto risco:
 - Pacientes HPV-negativos, que consomem até 20 cigarros por dia (incluindo não fumantes), T4;
 - Pacientes HPV-negativos, que consomem mais de 20 cigarros por dia;

- Pacientes HPV-negativos, N2b-N3.

Ao avaliar a SG, foi encontrado tempo médio de SG de 50,5 meses para o grupo baixo risco; 32,0 meses para o grupo risco intermediário e 20,9 meses para o grupo alto risco, sendo essa diferença entre os grupos significativa ($p=0,028$), o que indica que os pacientes de baixo risco têm melhor sobrevida do que os de risco intermediário, que por sua vez têm melhor sobrevida que os de alto risco. Na análise da SLD, o grupo de risco intermediário não apresentou o desfecho recidiva, então todos os casos foram censurados e não foi possível calcular o tempo médio de SLD, e a análise revelou que a diferença entre os grupos não foi significativa ($p=0,177$). Nesta análise, todos os pacientes com tumores HPV-positivos ficaram no grupo de baixo risco, pois não foi encontrada, no grupo de pacientes avaliados, a combinação de pacientes HPV-positivos que consumissem mais de 20 cigarros por dia, com metástase em linfonodo classificada em N2b-N3. Estes resultados podem ser visualizados na figura 9.

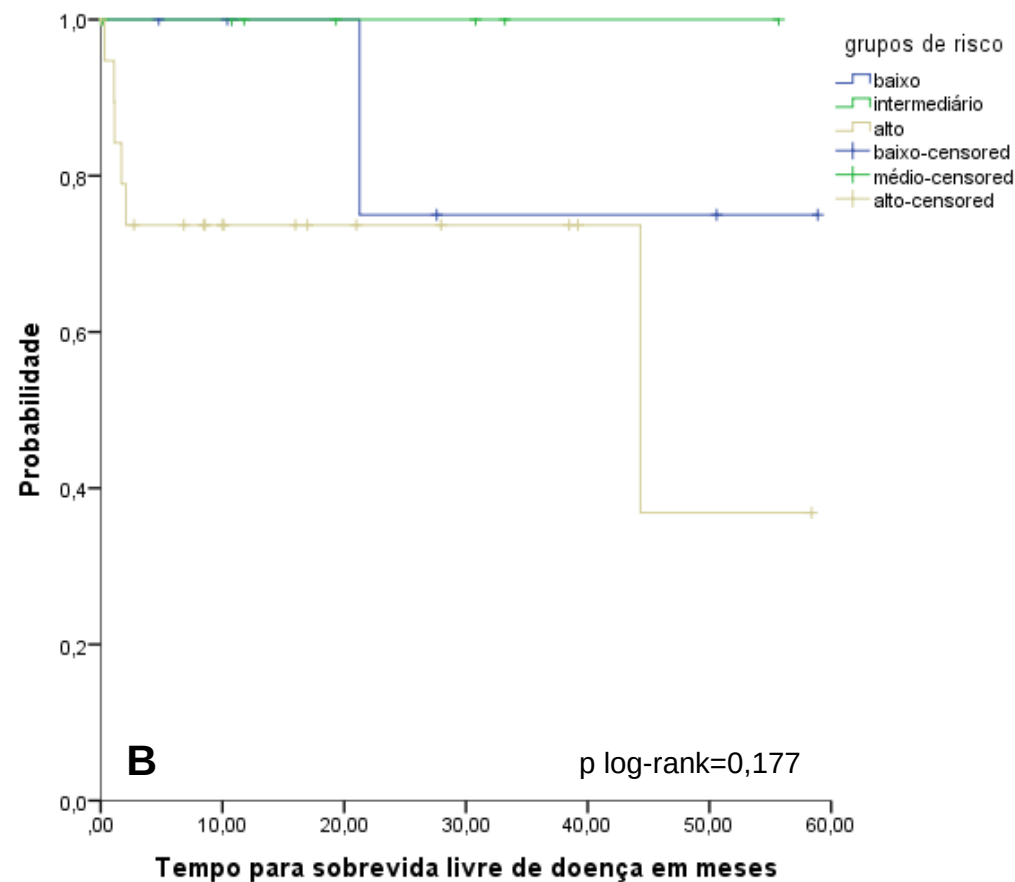
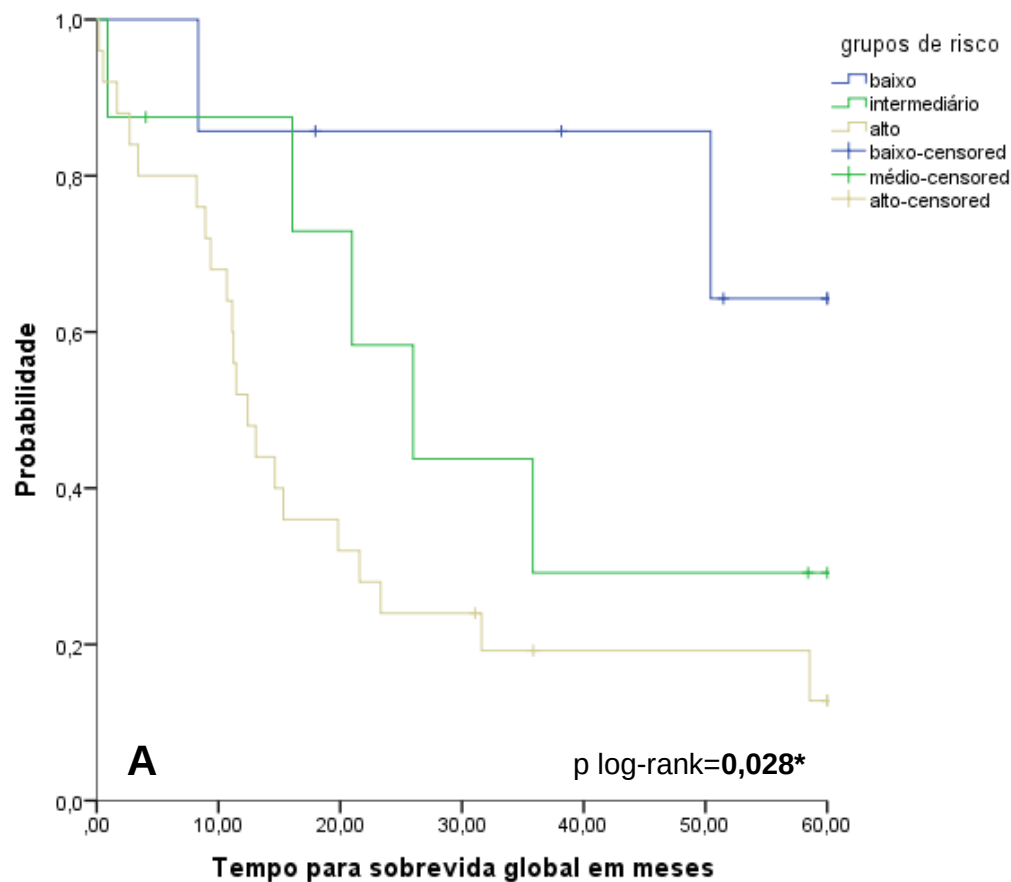


Figura 9. Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) em 60 meses associada aos grupos de risco avaliados em orofaringe. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Com a finalidade de tornar as análises mais uniformes, as 109 amostras de CE oral, submetidas a análise imuno-histoquímica das proteínas p16 e EGFR, foram analisadas separadamente das 40 amostras de CE orofaríngeo, nas quais foi realizada apenas a análise imuno-histoquímica da proteína p16.

4.3.1 Expressão de p16 e EGFR em amostras provenientes da cavidade oral

Das 109 amostras de CE oral submetidas à imuno-histoquímica, foram incluídas nas análises de expressão de p16 e EGFR, 95 e 99 amostras respectivamente, tendo sido excluídas as amostras que não apresentaram pelo menos 75% de área tumoral no campo de leitura. O grupo amostral avaliado continha amostras originadas do Brasil e do Reino Unido, e era composto predominantemente por homens, com tumores localizados na língua e estadiamento clínico avançado, consumidores de álcool e tabaco. Não foi encontrada associação entre as variáveis clínicas avaliadas ou fatores de risco e a expressão de p16. Quanto ao EGFR, foi encontrada associação entre a variável tamanho do tumor e a expressão do receptor, indicando que a alta expressão de EGFR foi observada em tumores avançados. Os dados clinicopatológicos, fatores de risco e suas associações com a expressão de p16 e EGFR se encontram sumarizados na Tabela 7.

Tabela 7. Análise imuno-histoquímica da expressão de p16 e EGFR em carcinoma epidermoide oral e sua associação com as variáveis clínicas e os fatores de risco tabagismo e etilismo.

Variáveis clínicas		Expressão de p16				p	Expressão de EGFR				p
		Baixa	(%)	Alta	(%)		Baixa	(%)	Alta	(%)	
Sexo	Masculino	63	86.3	10	13.7	0.726	41	52.6	37	47.4	0.325
	Feminino	20	90.9	2	9.1		14	66.7	7	33.3	
Sítio anatômico	Língua	58	87.9	8	12.1	0.882	36	52.2	33	47.8	0.398
	Assoalho	9	90.0	1	10.0		8	80.0	2	20.0	
	Outros	16	84.2	3	15.8		11	55.0	9	45.0	
Tamanho do tumor	T1/2	42	85.7	7	14.3	0.761	33	66.0	17	34.0	0.042*
	T3/4	40	88.9	5	11.1		21	44.7	26	55.3	
Metástase linfonodal	N0	39	81.2	9	18.8	0.213	26	53.1	23	46.9	0.831
	N+	35	92.1	3	7.9		23	57.5	17	42.5	
Estadiamento clínico	I/II	27	79.4	7	20.6	0.199	20	60.6	13	39.4	0.392
	III/IV	51	91.1	5	8.9		30	50.8	29	49.2	
Tabagismo	Sim/Ex	48	84.2	9	15.8	1.000	37	60.7	24	39.3	0.114
	Não	11	84.6	2	15.4		4	33.3	8	66.7	
Consumo de tabaco (incluindo não fumantes)	< 20/dia	30	81.1	7	18.9	0.504	16	43.2	21	56.8	0.087
	> = 20/dia	23	88.5	3	11.5		19	65.5	10	34.5	
Etilismo	Sim	38	84.4	7	15.6	0.418	30	63.8	17	36.2	0.183
	Não	18	94.7	1	5.3		9	45.0	11	55.0	

Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher. *p < 0,05

Algumas variáveis apresentam dados incompletos.

A fim de se avaliar a influência do sexo, as análises foram refeitas conforme tabela 8. No grupo do sexo masculino, foi encontrada associação entre a alta expressão de p16 e a ausência de metástase em linfonodos ($p=0,017$), assim como entre a baixa expressão de p16 e o estadiamento clínico avançado ($p=0,008$). No grupo do sexo feminino, houve associação entre a baixa expressão de p16 e tumores iniciais ($p=0,026$) e entre a baixa expressão de EGFR e os hábitos tabagistas ($p=0,035$).

Tabela 8. Associação por sexo entre expressão de p16 e EGFR com fatores prognósticos e fatores de risco em carcinoma epidermóide da cavidade oral.

Variáveis		Homens (n=85)										Mulheres (n=24)									
		p16				p	EGFR				p	p16				p	EGFR				p
		baixa	(%)	alta	(%)		baixa	(%)	alta	(%)		baixa	(%)	Alta	(%)		baixa	(%)	alta	(%)	
Tamanho do Tumor	T1/T2	24	77.42	7	22.58	0.088	21	63.64	12	36.36	0.109	18	100.00	0	0.00	0.026*	12	70.59	5	29.41	0.574
	T3/T4	38	92.68	3	7.32		19	44.19	24	55.81		2	50.00	2	50.00		2	50.00	2	50.00	
Metástase em Linfonodo	N0	28	75.68	9	24.32	0.017*	20	51.28	19	48.72	0.817	11	100.00	0	0.00	0.137	6	60.00	4	40.00	1.000
	N+	30	96.77	1	3.23		18	54.55	15	45.45		5	71.43	2	28.57		5	71.43	2	28.57	
Estadiamento Clínico	I/II	15	68.18	7	31.82	0.008*	14	63.64	8	36.36	0.213	12	100.00	0	0.00	0.147	6	54.55	5	45.45	0.633
	III/IV	45	93.75	3	6.25		24	47.06	27	52.94		6	75.00	2	25.00		6	75.00	2	25.00	
Tabagismo	Sim	40	83.33	8	16.67	0.235	29	55.77	23	44.23	0.651	8	88.89	1	11.11	1.000	8	88.89	1	11.11	0.035*
	Não	3	60.00	2	40.00		2	40.00	3	60.00		8	100.00	0	0.00		2	28.57	5	71.43	
Consumo de tabaco (incluindo não fumantes)	≤ 20/dia	20	74.07	7	25.93	0.152	12	42.86	16	57.14	0.111	10	100.00	0	0.00	0.231	4	44.44	5	55.56	1.000
	> 20/dia	21	91.30	2	8.70		17	65.38	9	34.62		2	66.67	1	33.33		2	66.67	1	33.33	
Etilismo	Sim	34	85.00	6	15.00	1.000	26	61.90	16	38.10	0.062	4	80.00	1	20.00	0.385	4	80.00	1	20.00	1.000
	Não	10	90.91	1	9.09		4	30.77	9	69.23		8	100.00	0	0.00		5	71.43	2	28.57	
Idade	Mediana						59										65				
	Média						60.06										62.00				
	Desvio																				
	Padrão						12.20										13.88				

Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, p < 0,05.

Algumas variáveis apresentam dados incompletos.

Quanto à análise de sobrevida, a maioria dos pacientes analisados estava vivo até o ultimo acompanhamento e não apresentava recidiva. Para os pacientes incluídos na análise de expressão de p16, o tempo médio de seguimento foi de 35,7 meses (95% IC = 30,6 – 40,9), enquanto para os pacientes incluídos na análise de expressão de EGFR, o tempo médio de seguimento foi de 36,1 meses (95% IC = 31,0 – 41,1). Ao avaliar a SG relacionada ao EGFR, não houve diferença significativa entre baixa e alta expressão ($p=0,968$), tendo sido observado um tempo de sobrevida médio de 35 meses tanto para os pacientes cujos tumores apresentaram baixa expressão do receptor quanto alta expressão. Já para a SLD, foi observado um tempo de sobrevida de 39,3 meses em pacientes com tumores com baixa expressão de EGFR, enquanto 33,1 meses foi o tempo médio para aqueles com tumores com alta expressão. No entanto, também não houve diferença significativa (Figura 10). Nossos resultados não nos permitiram confirmar a relação entre a alta expressão de EGFR e a menor sobrevida em pacientes com tumores da cavidade oral e, portanto, o EGFR não seria útil como biomarcador de prognóstico nesses pacientes.

A expressão de p16 também não mostrou relação com a SG ($p=0,757$) e a SLD ($p=0,377$), conforme pode ser observado na Figura 11, porém é possível observar uma queda acentuada no intervalo de 30 a 40 meses na curva da SLD em pacientes com alta expressão de p16, e que são todos HPV-negativos.

A fim de avaliar se há alguma diferença entre a localização geográfica e os desfechos avaliados, foi feita a análise de SG e SLD para o grupo de amostras do Reino Unido e do Brasil, separadamente, associadas à infecção por HPV, expressão de p16 e de EGFR. Não foram encontradas diferenças. Os gráficos de sobrevida podem ser visualizados na Figura 12 e Figura 13.

A avaliação da expressão de EGFR e p16, para testar a aplicabilidade destes como biomarcadores de progressão, foi realizada nos segmentos epitélio adjacente, displasia e tumor, utilizados a fim de se estabelecer um modelo de progressão. Esta análise foi feita pelo teste de Kruskal-Wallis, tendo sido utilizado o valor obtido pelo método de H-Score. O EGFR, que apresentou alta expressão em tumores localmente avançados, de acordo com a análise das médias, parece ter uma expressão crescente à medida em que é simulada uma progressão através dos segmentos epitélio adjacente – displasia – tumor. Porém, não houve relação

significativa entre a expressão de EGFR nos diferentes segmentos avaliados. Este mesmo comportamento foi observado na análise de expressão de p16 (Tabela 9). Portanto, não foi possível confirmar a aplicabilidade dos possíveis biomarcadores de progressão avaliados e, provavelmente, nem EGFR e nem p16 poderão ser utilizados como biomarcadores de progressão. Na figura 14, estão representadas as fotomicrografias dos segmentos analisados e a imunomarcação de EGFR e p16 em cada um deles, bem como pode ser visualizado em boxplot o resultado obtido nas análises da tabela 9.

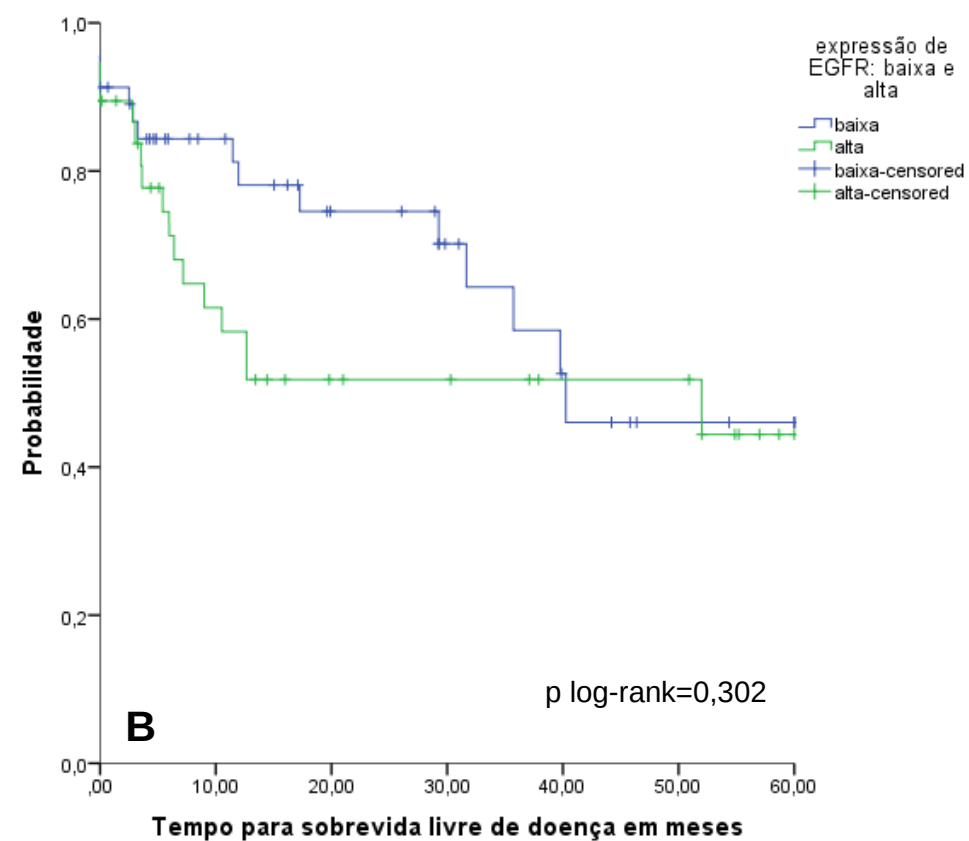
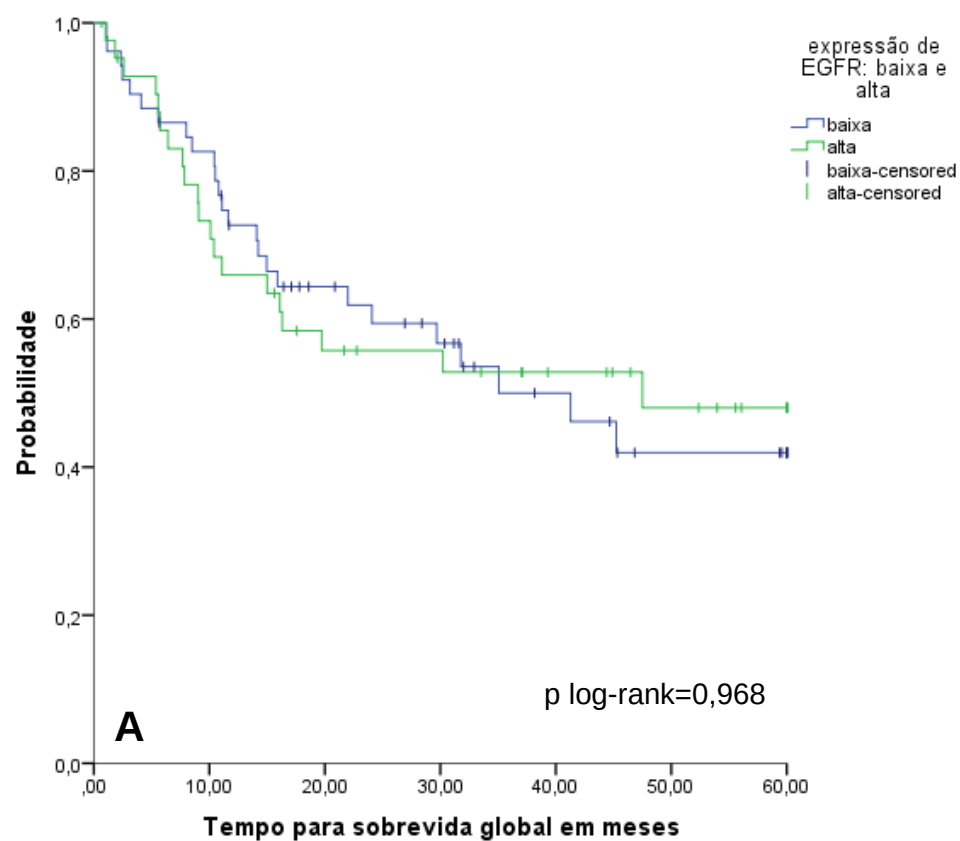


Figura 10. Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) em 60 meses associada à expressão de EGFR em cavidade oral. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados

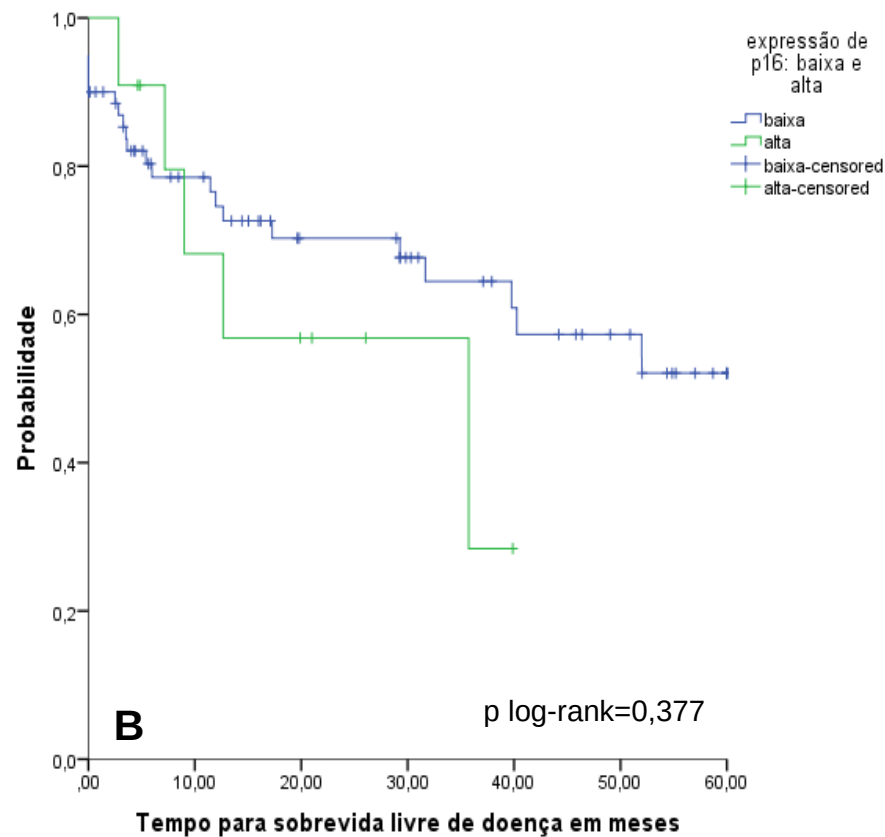
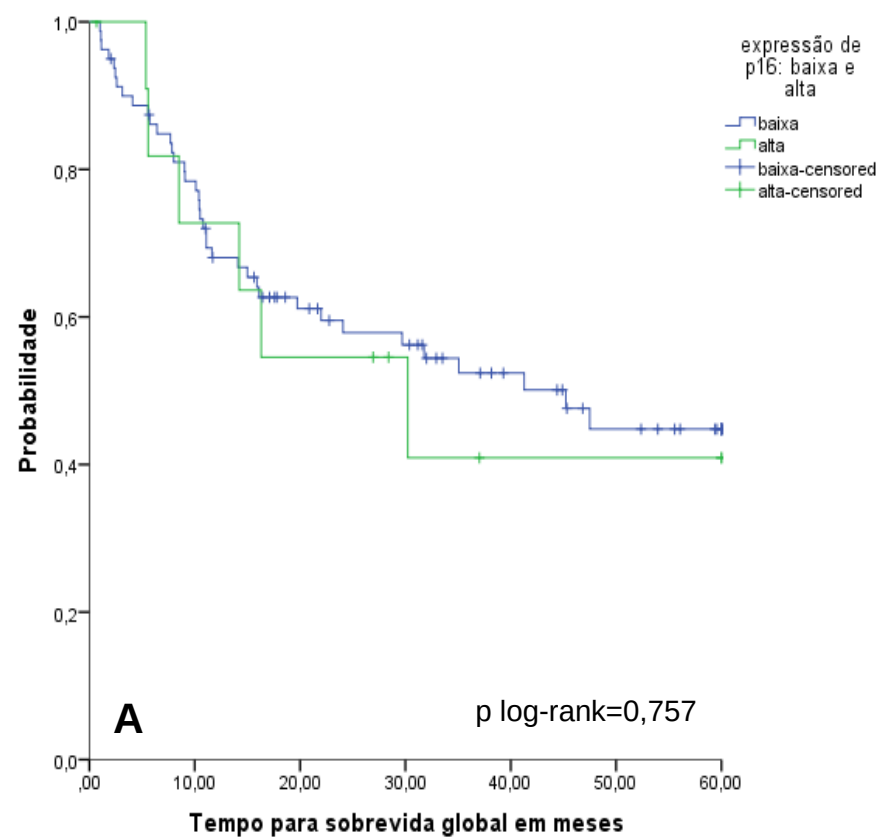


Figura 11. Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) em 60 meses associada à expressão de p16 em cavidade oral. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados.

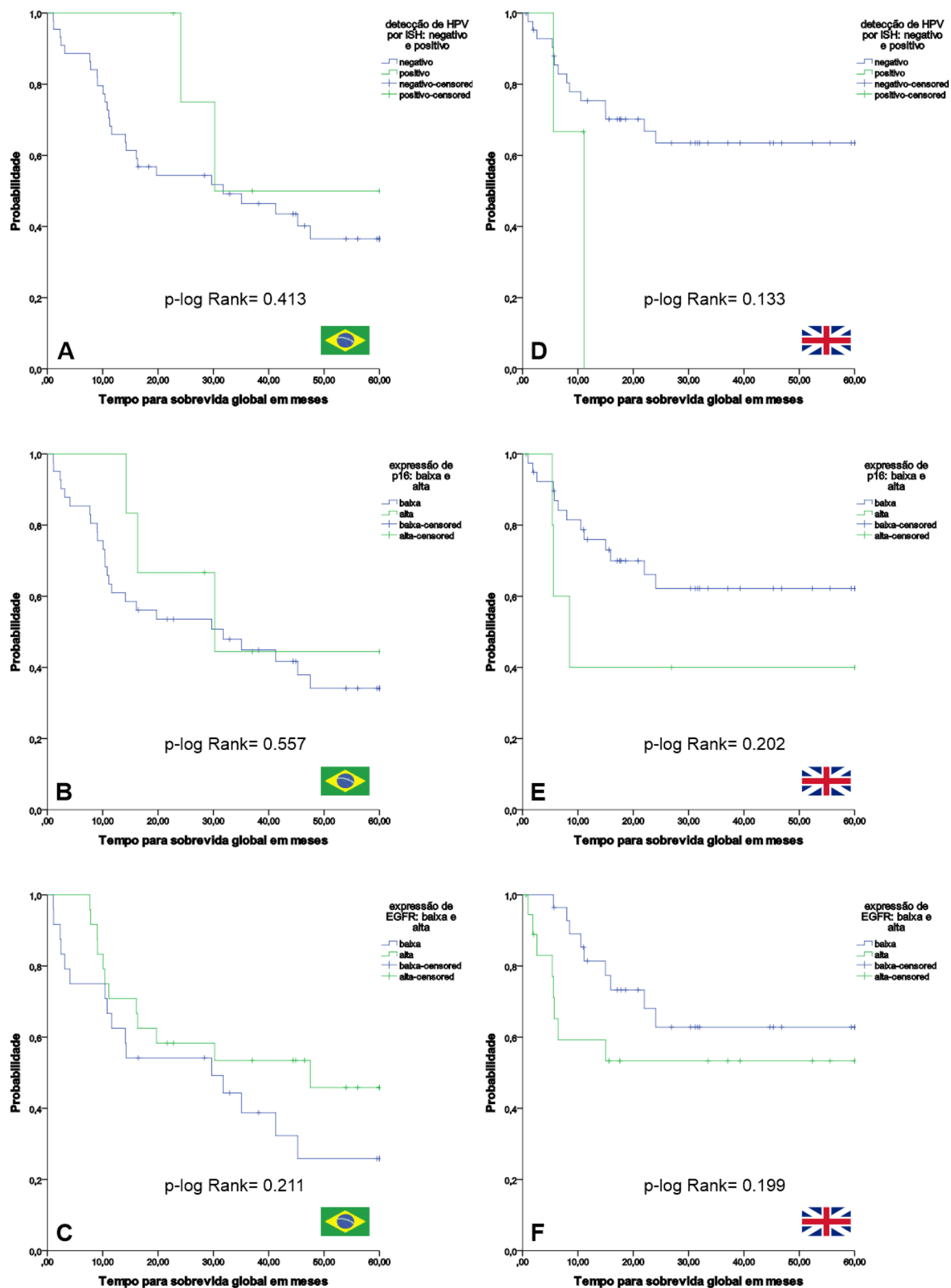


Figura 12. Sobrevida Global em 60 meses associada à infecção por HPV (A, D), expressão de p16 (B, D) e expressão de EGFR (C, F) em CE da cavidade oral nas amostras do Brasil e do Reino Unido. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados.

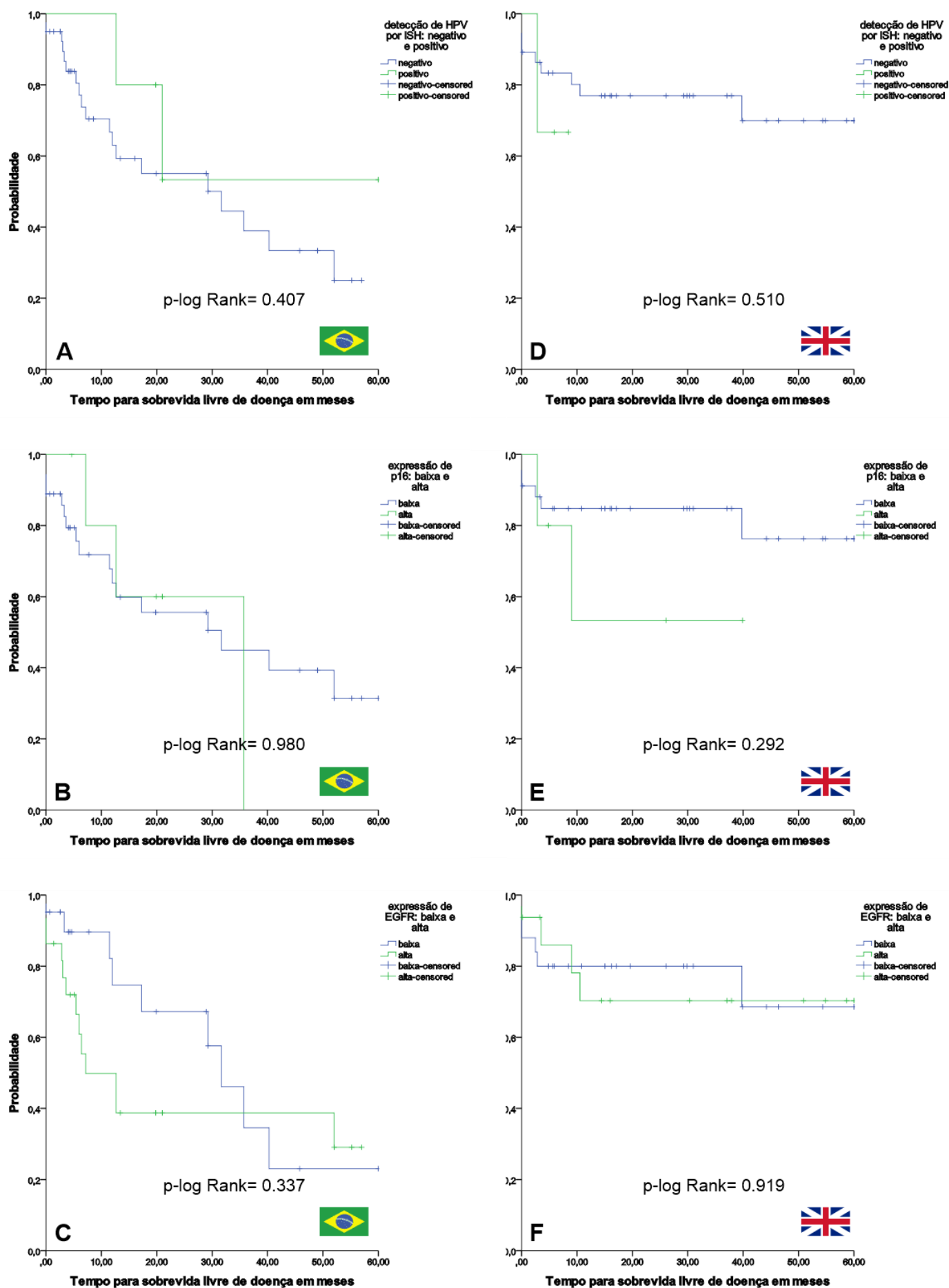


Figura 13. Sobrevida Livre de Doença em 60 meses associada à infecção por HPV (A, D), expressão de p16 (B, E) e expressão de EGFR (C, F) em CE da cavidade oral nas amostras do Brasil e do Reino Unido. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados.

Tabela 9. Distribuição dos segmentos epitélio adjacente, displasia e tumor e comparação entre as médias de expressão.

Marcadores/Segmentos		Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	p
p16	adjacente	15,09	5,00	22,68	0,00	105,00	0,165
	displasia	35,60	0,00	71,07	0,00	300,00	
	tumor	33,71	0,00	81,10	0,00	300,00	
EGFR	adjacente	15,89	10,00	17,15	0,00	63,33	0,176
	displasia	23,88	3,33	60,14	0,00	300,00	
	tumor	34,14	10,00	64,70	0,00	300,00	

Teste de Kruskal-Wallis

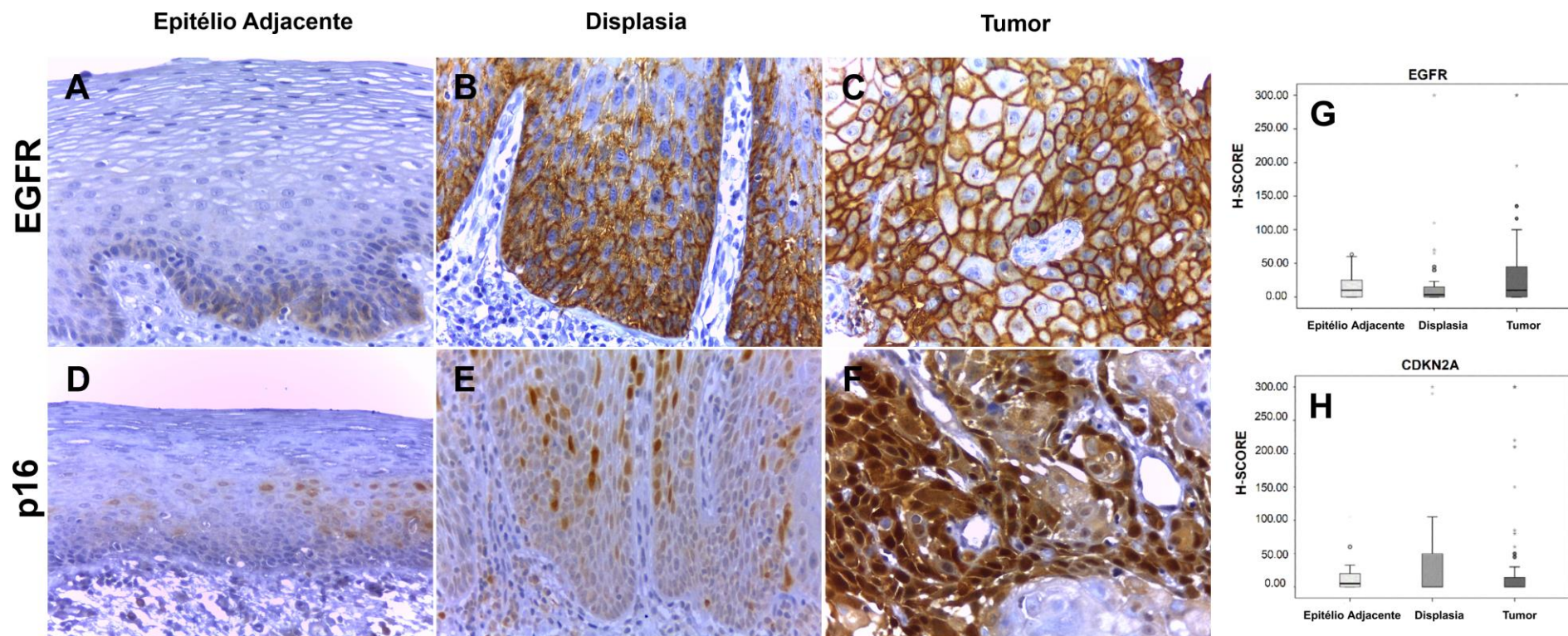


Figura 14. Fotomicrografias da imunomarcção de p16 e EGFR nos segmentos epitélio adjacente (A, D), displasia (B, E) e tumor (C, F), considerando as marcações nuclear e citoplasmática para p16 e marcação membranar para EGFR. Marcações referentes à baixa expressão de EGFR e p16 podem ser observadas em A e D, enquanto as referentes à alta expressão podem ser observadas em C e F. Comparação entre as médias de expressão, em boxplot, de acordo com os resultados obtidos com o teste de Kruskal-Wallis para a expressão de EGFR (G) e p16 (H). Aumento de 400x (A, B, C, D, E, e F).

4.3.2 Expressão de p16 em amostras provenientes de orofaringe

A expressão de p16 foi analisada em 37 de 40 amostras de CE orofaríngeo submetidas à imuno-histoquímica. Neste grupo, a maioria dos casos foi composta por homens, com idade abaixo de 60 anos, apresentando tumores localizados em base de língua com tamanho avançado, ausência de metástase linfonodal, tabagistas e etilistas. A análise imuno-histoquímica da expressão da proteína p16 em CE orofaríngeo não mostrou associação com as variáveis clínicas ou fatores de risco analisados. Foram então removidas das análises as 3 amostras de pacientes do sexo feminino, restando apenas os homens na análise. Ainda assim, não foi observada nenhuma associação, o que nos indica que as mulheres que faziam parte do grupo total não exerceram influência significativa nos resultados. Estas análises podem ser visualizadas na Tabela 10.

Ao avaliar a SG associada à expressão da proteína p16, foi observado um tempo médio de 25,6 meses para os pacientes cujos tumores apresentaram baixa expressão e 30,4 meses para os pacientes com tumores com alta expressão de p16. Porém, não houve diferença significativa entre a SG de pacientes com baixa e com alta expressão ($p=0,699$). Na análise da SLD foi observado um tempo médio de 48,2 meses para baixa expressão e de 19,5 meses para alta expressão, e ainda assim não foi observada diferença significativa entre a sobrevida de pacientes com baixa e com alta expressão da proteína p16 ($p=0,168$). As curvas de SG e SLD podem ser observadas na Figura 10. Porém, analisando os resultados não foi observada relação entre a alta expressão de p16 e melhor sobrevida de pacientes com tumores da orofaringe. No entanto, é importante lembrar que estudos prévios mostraram que não existe uma correlação absoluta entre a expressão de p16 e a infecção por HPV (NAUTA et al., 2018).

Tabela 10. Análise imuno-histoquímica da expressão de p16 em carcinoma epidermoide orofaríngeo e sua associação com as variáveis clínicas e os fatores de risco tabagismo e etilismo, em ambos os sexos e somente no sexo masculino.

Variáveis		Homens e Mulheres (n=37)						Homens (n=34)					
		p16				p	p16						
		baixa	(%)	alta	(%)		baixa	(%)	alta	(%)			
Sexo	Masculino	26	76.47	8	23.53	1.000	-	-	-	-	-		
	Feminino	2	66.67	1	33.33		-	-	-	-			
Sítio Anatômico	Tonsila	8	57.14	6	42.86	0.087	8	61.54	5	38.46	0.206		
	Base de língua	12	92.31	1	7.69		11	91.67	1	8.33			
	Palato mole	8	80.00	2	20.00		7	77.78	2	22.22			
Tamanho do Tumor	T1/T2	10	76.92	3	23.08	1.000	10	76.92	3	23.08	1.000		
	T3/T4	18	75.00	6	25.00		16	76.19	5	23.81			
Metástase em Linfonodo	N0	17	73.91	6	26.09	1.000	15	75.00	5	25.00	1.000		
	N+	11	78.57	3	21.43		11	78.57	3	21.43			
Estadiamento Clínico	I/II	4	57.14	3	42.86	0.327	4	57.14	3	42.86	0.315		
	III/IV	24	80.00	6	20.00		22	81.48	5	18.52			
Tabagismo	Sim/Ex	27	77.14	8	22.86	0.432	25	78.13	7	21.88	0.421		
	Não	1	50.00	1	50.00		1	50.00	1	50.00			
Consumo de tabaco (incluindo não fumantes)	≤ 20/dia	25	75.76	8	24.24	1.000	23	76.67	7	23.33	1.000		
	> 20/dia	3	75.00	1	25.00		3	75.00	1	25.00			
Etilismo	Sim	27	77.14	8	22.86	0.432	25	78.13	7	21.88	0.421		
	Não	1	50.00	1	50.00		1	50.00	1	50.00			

Teste de Qui-quadrado ou Exato de Fisher, $p < 0,05$.

Algumas variáveis apresentam dados incompletos.

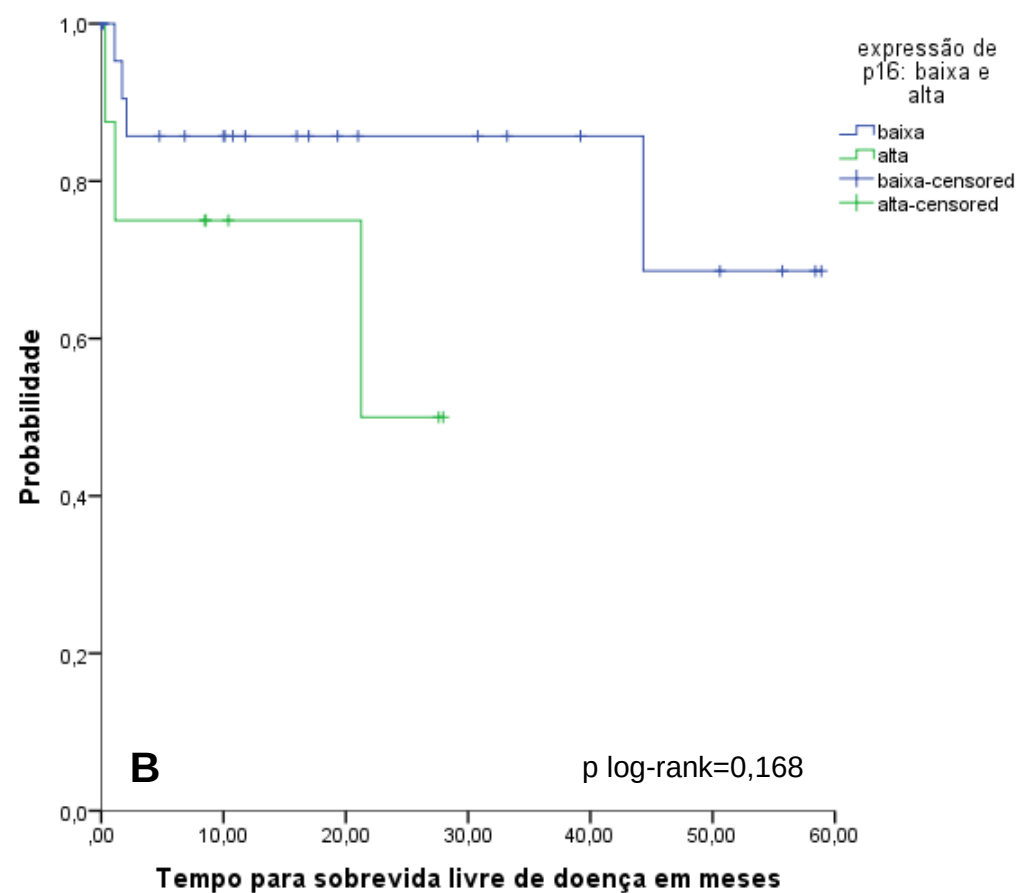
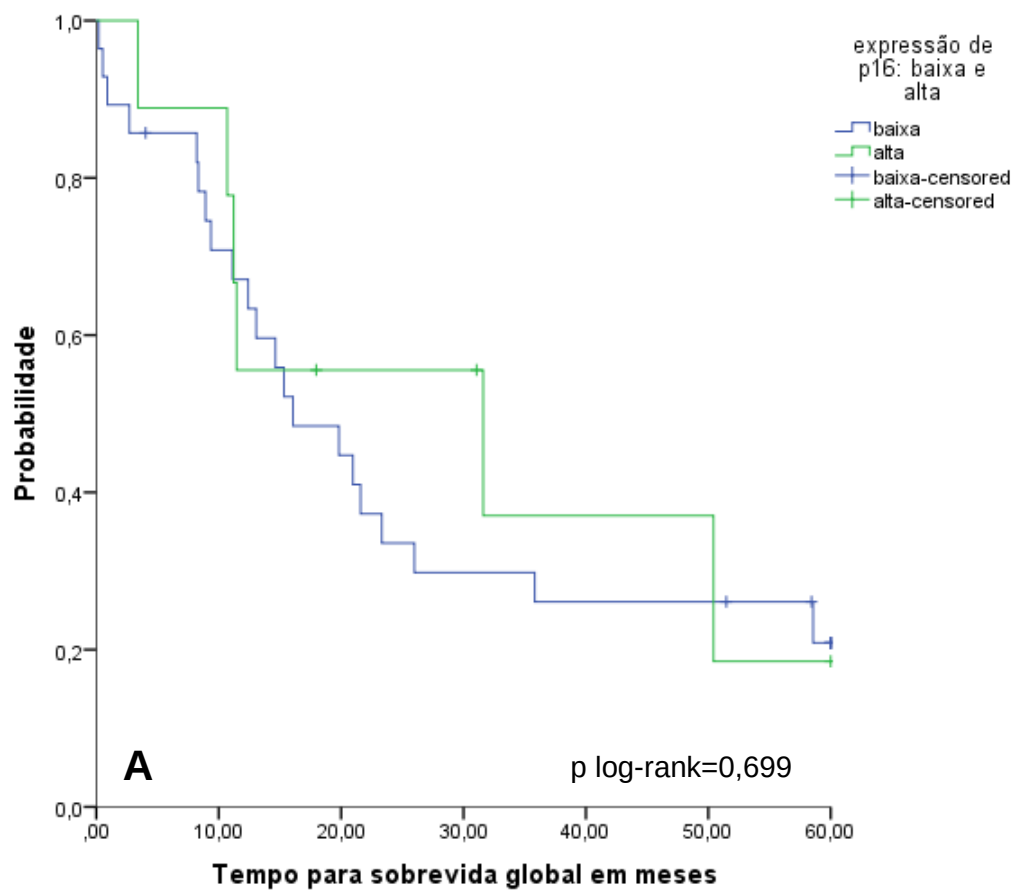


Figura 15. Sobrevida Global (A) e Sobrevida Livre de Doença (B) em 60 meses associada à expressão de p16 em orofaringe. Probabilidade de sobrevida acumulada de acordo com Kaplan-Meier. Os traços na curva representam dados censurados

5 DISCUSSÃO

5.1 DETECÇÃO DE HPV

A detecção de HPV por hibridização in situ utilizando sondas de RNA realizada neste estudo e os dados gerados confirmam o que outros estudos já vêm mostrando, com maior frequência de infecção por HPV em CE orofaríngeo, quando comparado aos demais sítios da cabeça e pescoço, podendo variar até mesmo numa faixa de aproximadamente 50 a 80%, dependendo da população estudada e da região geográfica (CASTELLSAGUÉ et al., 2016; HAEGGBLOM et al., 2017; NAUTA et al., 2018). Porém, nas amostras utilizadas nesta pesquisa, a frequência de tumores HPV-positivos em orofaringe foi baixa, se aproximando da frequência em cavidade oral. Esta diferença pode estar relacionada ao perfil dos pacientes acometidos por estes tumores no Espírito Santo, caracterizado por indivíduos com idade mais avançada e alto consumo de tabaco e álcool, e descartando a atuação do HPV como fator de risco principal na oncogênese da orofaringe nestes pacientes.

Um estudo comparativo no qual foram incluídos indivíduos com câncer de cavidade oral e orofaringe, provenientes do Brasil e da Alemanha revelou que, em países em desenvolvimento, como o Brasil, tem sido observado aumento na incidência do câncer oral e não de orofaringe, como observado em outros estudos (ANG et al., 2010; CHATURVEDI et al., 2013), sendo o HPV associado ao câncer de cabeça e pescoço relativamente incomum na população brasileira, descrevendo uma frequência de 11% (HAUCK et al., 2015), o que está de acordo com os achados em orofaringe deste estudo, com frequência de 10%.

As frequências encontradas neste estudo não foram muito distantes das que são comumente encontradas em indivíduos saudáveis. Além disso, as frequências de HPV encontradas em indivíduos saudáveis em cavidade oral e orofaringe também são bem próximas, o que sugere ainda mais que, neste estudo, o HPV não tem uma posição de destaque na carcinogênese em cavidade oral e orofaringe. Uma revisão sistemática e metanálise de Sturgis e colaboradores (2018) relatou uma prevalência de HPV em cavidade oral em indivíduos saudáveis de 7,7%; Bettampadi e

colaboradores (2019) encontraram, em cavidade oral de indivíduos saudáveis, uma prevalência total de HPV de 8,7%, e HPV de alto risco o equivalente a 5,4%. Um estudo de Rieth e colaboradores (2018) encontrou uma frequência de HPV total em orofaringe de 4,9%, com 3,9% dos indivíduos portando HPV de alto risco.

Em nosso estudo, foi possível verificar uma diferença na detecção entre as técnicas, comparando a detecção do RNAm E6/E7 HPV e a do DNA do HPV, decorrente de achados positivos no uso da ISH-RNA em amostras com ausência de DNA do HPV por PCR. Esta diferença indica maior sensibilidade da detecção de RNAm E6/E7 HPV por ISH comparada à detecção de DNA HPV por PCR. Resultados similares já foram obtidos em estudos prévios, e podem estar relacionados a uma infecção por HPV biologicamente relevante, derivada de um vírus transcricionalmente ativo (SCHACHE, a G et al., 2013; UKPO et al., 2011; WANG, Fay et al., 2012; WANG, Hongwei et al., 2014). A técnica empregada, assim como o tipo de amostra a ser avaliada, tem grande influência na detecção do vírus, e quanto maior a sensibilidade da técnica e melhor a conservação das amostras a serem avaliadas, maior é a confiabilidade e o sucesso da técnica empregada. Para o estudo do HPV, a detecção de RNAm E6/E7 HPV indicam não somente a presença do HPV, mas se o vírus está transcricionalmente ativo. Portanto, é inegável a sensibilidade desta técnica para a detecção de um HPV atuante na carcinogênese viral, e por isso tem-se esta detecção como padrão ouro.

Ao estratificar os pacientes em grupos de risco, considerando fatores prognósticos já conhecidos e incluindo o HPV, e comparando os grupos de risco na SG e SLD, foi possível enquadrar todos os pacientes com tumores HPV-positivos no grupo de baixo risco, independente de tamanho de tumor, estadiamento ou metástase em linfonodo. A sobrevida destes pacientes se assemelha à sobrevida dos pacientes com tumores HPV-negativos com baixo consumo de tabaco e com tumores de tamanhos iniciais, pacientes estes que a literatura já tem amplas evidências de que apresentam melhor sobrevida em comparação a pacientes com alta exposição diária ao tabaco, com tumores de tamanhos avançados e com metástase linfonodal. (HUBER; TANTIWONGKOSI, 2014; MAYNE et al., 2009). Isso sugere que, de

alguma forma a infecção por HPV biologicamente relevante exerce influência na sobrevida dos pacientes tanto quanto os fatores prognósticos já estabelecidos.

5.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA EM CAVIDADE ORAL E OROFARINGE

Quanto às análises imuno-histoquímicas realizadas, a expressão da proteína p16 não mostrou ser um bom biomacador de prognóstico em pacientes com CE oral. Sendo assim, justifica a não inclusão desse biomacador na análise de tumores de cavidade oral, como preconizado no novo estadiamento para a orofaringe (AMIN et al., 2017; BRIERLEY; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2017). A ausência de relação entre a expressão de p16 em tumores da cavidade oral e a SG ou SLD também é relatada em outros estudos (PALVE et al., 2018; ZAFEREO et al., 2016).

O predomínio da baixa expressão da proteína p16 nas amostras de CE oral avaliadas é mais um fator que pode sugerir que a maioria dos tumores avaliados não tem como principal fator causal o HPV. Neste estudo houve ausência de relação entre a expressão de p16 e a infecção por HPV em tumores cavidade oral, e outros estudos em CE oral mostram que existe uma porcentagem de tumores p16-positivos que não são HPV-positivos (LAI et al., 2017; SGARAMELLA et al., 2015; ZAFEREO et al., 2016), e possivelmente os principais fatores de risco para o desenvolvimento destes tumores são o consumo de tabaco e álcool.

Ao dividir as análises por sexo, no grupo do sexo masculino, foi encontrada associação entre a alta expressão de p16 e a ausência de metástase em linfonodos e entre a baixa expressão de p16 e o estadiamento clínico avançado. No grupo do sexo feminino, houve associação entre a baixa expressão de p16 e tumores iniciais. Este comportamento pode ser explicado pela ação de supressão tumoral da proteína p16, para a qual a literatura relata a prevalência de baixa expressão de p16 em tumores da cavidade oral, além de relacionar a perda progressiva de p16 a tumores metastáticos (BABIKER et al., 2014).

Em tumores da orofaringe, não foi encontrada relação entre a expressão de p16 e os desfechos dos pacientes (óbito e recidiva), de forma contrária ao que preconiza o novo estadiamento. Desta forma, os pacientes p16-positivos das amostras deste estudo parecem não refletir o prognóstico esperado pelo novo estadiamento, possivelmente explicado pelo HPV não ser o principal fator de risco para o desenvolvimento dos tumores deste estudo e, desta forma, os tumores p16-positivos não são necessariamente HPV-positivos. A heterogeneidade geográfica também pode explicar este fato, já que estudos indicam que uma porcentagem pequena dos tumores de orofaringe no Brasil tem sido associada à infecção por HPV (ANANTHARAMAN et al., 2017).

Ao reunir todos os pacientes do estudo, de cavidade oral e orofaringe, e refazer as análises, foi encontrada associação entre baixa expressão de p16 e pacientes HPV-negativos. Com isso, é possível avaliar o uso de p16 como ferramenta de rastreio na rotina clínica, detectando pacientes que não sejam HPV-positivos para seguir o tratamento padrão.

Nossos dados relacionados à expressão de EGFR em tumores da cavidade oral estão de acordo com outros estudos que confirmaram que a alta expressão de EGFR em tumores de cabeça e pescoço tem sido relacionadas a um pior prognóstico. Isto pode ser explicado porque a ativação de EGFR por seus ligantes leva a ativação de vias que favorecem a progressão tumoral, o que justifica a sua maior expressão principalmente em tumores mais avançados, que já apresentam maior proliferação celular (BURTNESS; BAUMAN; GALLOWAY, 2013; BYEON; KU; YANG, 2019; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018).

Ao dividir as amostras por sexo e reavaliar, no grupo do sexo feminino houve associação entre a baixa expressão EGFR e os hábitos tabagistas. Porém, este é um dado não condizente com os achados da literatura, que mostram haver alta expressão em pacientes tabagistas, e isto ocorre justamente porque o tabaco está relacionado a um dos ligantes do EGFR (BYEON; KU; YANG, 2019; CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015). Portanto, seriam necessários maiores estudos para avaliar se existe de fato esta relação entre baixa expressão de EGFR e

consumo de tabaco em mulheres e se ela está relacionada a alguma via ainda não conhecida.

Ao avaliar a relação entre o tamanho do tumor e a expressão de EGFR, consideramos válido testar um modelo de progressão a fim de comparar a expressão de EGFR em tecido normal, displásico e no carcinoma epidermoide propriamente dito. Porém, o modelo não mostrou que o EGFR possa ser utilizado como um biomarcador de progressão.

Não foi possível confirmar a relação entre a alta expressão de EGFR e a menor sobrevida em pacientes com tumores da cavidade oral e, portanto, o EGFR não seria útil como biomarcador de prognóstico nesses pacientes. Estudos previamente publicados também não observaram relação entre a expressão de EGFR e a SG ou SLD, indicando que o EGFR não é um bom biomarcador de prognóstico em CE oral, e ainda, que não parece ser um biomarcador preditivo clinicamente útil em pacientes com câncer de cabeça e pescoço (COSTA, V. et al., 2018; PERISANIDIS et al., 2013; SABA et al., 2019). Porém, a alta expressão de EGFR em tumores avançados, como a encontrada neste estudo, justifica a sua aplicação como alvo terapêutico, podendo o uso do cetuximabe beneficiar pacientes com doença localmente avançada.

Estudos mostram que o cetuximabe, anticorpo monoclonal específico para EGFR utilizado em câncer de cabeça e pescoço, tem como principais efeitos a redução no crescimento de linhagens de células tumorais, além de favorecer a apoptose. Geralmente é utilizado com sucesso em terapia combinada. A inibição de EGFR feita pelo cetuximabe melhora a eficácia da radioterapia. Quando utilizada isoladamente em tumores recorrentes ou metastáticos, a taxa de resposta não excede 13%. Combinada à quimioterapia, tende a aumentar a sobrevida livre de progressão. Outro fato associado ao cetuximabe é a frequente resistência à medicação, que ocorre com o tempo (SABA et al., 2019; TABERNA; OLIVA; MESÍA, 2019). Já é conhecida em câncer de pulmão a ocorrência de mutações de resistência envolvendo os exons 19 e 20 no gene do EGFR (NAGANO; TACHIHARA; NISHIMURA, 2018). Para câncer colorretal, para o qual o cetuximabe também é indicado, tem sido reconhecida a ocorrência de mutação em K-ras e B-raf,

efetores da via de sinalização do EGFR, com aplicação como marcadores genômicos para auxiliar na conduta terapêutica e indicar o uso ou não do cetuximabe no tratamento deste câncer. Para câncer de cabeça e pescoço, os mecanismos de resistência tem sido estudados (DA COSTA, Alexandre A B A et al., 2018; EZE et al., 2019).

Apesar da tendência do aumento na sobrevida livre de progressão quando utilizado anticorpo humanizado anti EGFR associado à quimioterapia, o estudo de Saba e colaboradores (2019) ressalta que esse benefício ocorreu de forma independente da expressão de p16 no tumor ou do status HPV, o que reforça também os achados do nosso estudo quanto a relação entre expressão de EGFR, expressão de p16 e status HPV. É relatado no estudo de Saba e colaboradores também que, apesar dos indícios da existência de uma relação inversa entre o status do HPV e a expressão do EGFR, não há evidências definitivas para direcionar o uso do cetuximabe com base no status HPV, assim como o constatado em nosso estudo, que não mostrou relação entre a expressão de EGFR e status HPV.

Em câncer cervical, a relação entre EGFR, HPV e tabagismo tem sido estudada. No estudo de Munõz e colaboradores (2018) relata que as oncoproteínas do HPV estão relacionadas às componentes da fumaça do cigarro, e a superexpressão de E6 e E7 mediada por esses componentes é dependente da fosforilação de EGFR, o que culmina na expressão aumentada deste receptor. Apesar de não termos encontrado relação entre EGFR e HPV em tumores da cavidade oral, nem mesmo a relação inversa esperada entre eles, as amostras tumorais com resultado HPV-positivos e com alta expressão de EGFR do nosso estudo foram originadas de pacientes tabagistas.

5.3 ARTIGOS CIENTÍFICOS DERIVADOS DA TESE

Manuscrito 1 - Frequency of HPV in oral squamous carcinoma

O manuscrito intitulado “Frequency of HPV in oral squamous carcinoma” foi aceito para publicação em 19 de março de 2018 no periódico BMC Cancer, Qualis A2 na área de Biotecnologia, conforme Figura 16.

Submissions with an Editorial Office Decision for Author Priscila Marinho Abreu, MS

Page: 1 of 1 (1 total completed submissions)

Display 10 results per page.

A

Action	Manuscript Number	Title	Authorship	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status	Date Final Disposition Set	Final Disposition
Action Links	BMC-D-16-01484	Frequency of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma.	Other Author	19 Jul 2016	19 Mar 2018	Final Decision Accept	19 Mar 2018	Accept

B

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1471-2407	BMC CANCER (ONLINE)	BIOTECNOLOGIA	A2

Início

Anterior

1

Próxima

Fim

1 a 1 de 1 registro(s)

 Sucupira

 CAPES

 UERN

 RNP
REDE NACIONAL DE
ENSINO E PESQUISA

 MINISTÉRIO DA
EDUCAÇÃO

 GOVERNO
FEDERAL

Figura 16. Comprovante de aceite do artigo “Frequency of HPV in oral squamous carcinoma” para publicação (A) e Classificação no Qualis Capes, na área de Biotecnologia (B).

TITLE PAGE

Frequency of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma.

Priscila Marinho de Abreu¹ (Email address: priscilamarinho84@gmail.com)

Anna Clara Gregório Cór² (Email address: annaclaragc@gmail.com)

Pedro Leite Azevedo² (Email address: pedro.azevedo01@hotmail.com)

Isabella Bittencourt do Valle¹ (Email address: isabellabdv@hotmail.com)

Karine Gadioli de Oliveira³ (Email address: karinegadioli@hotmail.com)

Sônia Alves Gouvea³ (Email address: gouveasa@yahoo.com.br)

Melissa Freitas Cordeiro-Silva⁴ (Email address: melissafcs@yahoo.com.br)

Iúri Drummond Louro¹ (Email address: iurilouro@yahoo.com)

José Roberto Vasconcelos de Podestá⁵ (Email address: podestajr@gmail.com)

Jeferson Lenzi⁵ (Email address: jefersonlenzi@hotmail.com)

Agenor Sena⁵ (Email address: agenorsena@yahoo.com.br)

Elismauro Francisco de Mendonça⁶ (Email address: elismaur@ufg.br)

Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler^{1,2} (Email address: sandra.zeidler@ufes.br)

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

²Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

³Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

⁴Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

⁵Programa de Prevenção e Detecção Precoce do Câncer Bucal, Setor de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Hospital Santa Rita de Cássia, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

⁶Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

Corresponding author: Sandra Ventorin von Zeidler D.D.S., MS, PhD

Departamento de Patologia.

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Espírito Santo.

Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe, Vitória, ES, Brazil. ZIP Code 29.040-090. Telephone number: + 55 27

3335-7299 Fax number: + 55 27 3335-7290.

E-mail address: sandra.zeidler@ufes.br

Abstract

Background. The prevalence of high-risk human papillomavirus (HPV) DNA in cases of oral cavity squamous cell carcinoma (SCC) varies widely. The aim of this study is to investigate the frequency of high-risk HPV DNA in a large Brazilian cohort of patients with oral cavity SCC. **Methods.** Biopsy and resected frozen and formalin-fixed paraffin-embedded specimens of oral cavity SCC were available from 101 patients who were recruited at two Brazilian centres. Stringent measures with respect to case selection and prevention of sample contamination were adopted to ensure reliability of the data. Nested PCR using MY09/MY11 and GP5⁺/GP6⁺ as well as PGMY09/11 L1 consensus primers were performed to investigate the presence of HPV DNA in the tumours. HPV-positive cases were subjected to direct sequencing. Shapiro–Wilk and Student t test were used to evaluate data normality and to compare the means, respectively. Qualitative variables were analysed by logistic regression. **Results.** Our results demonstrate that the frequency of high-risk HPV types in oral cavity SCC is very low and is less than 4%. All HPV-positive cases were HPV16. In addition, our results do not show a significant association between the tumour clinical features and the risk factors (tobacco, alcohol and HPV) for oral cavity SCC. **Conclusion.** In the current study, we observed an overlapping pattern of risk factors that are related to tumour development. This, along with a low frequency of high-risk HPV DNA, supports the findings that HPV is not involved in the genesis of oral cavity SCC in Brazilian population.

Keywords

Oral cancer, HPV, Frequency, Incidence, Oral cavity, Squamous cell carcinoma, Human papillomavirus.

Background

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a significant cause of cancer morbidity worldwide as 650 000 new cases and 350 000 deaths occur every year [1]. HNSCC encompasses tumours of the oral cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx, which are each associated with different risk factors and prognoses. Latin America has a relatively high incidence of these tumours [1]. It was estimated that 15 290 new cases of oral cavity squamous cell carcinoma (SCC) occurred in Brazil in 2015 [2]. The oral cavity is the most frequent site of cancer within the head and neck region and is in the “top ten” list of tumours with the highest incidences [1].

HNSCC is one of several cancers that is strongly associated with tobacco and alcohol use [3]. However, over the last 15 years, high-risk (HR) human papillomavirus (HPV) infection has also been aetiologically linked to a subset of HNSCCs. HPV involvement in oral and oropharyngeal carcinogenesis was first proposed by Syrjanen et al. in 1983 [4]. In 2007, the International Agency for Research on Cancer recognized human papillomavirus type 16 (HPV16) as the only carcinogenic type of HPV in sites other than the cervix uteri, including the anus, penis, vagina, vulva, oral cavity and oropharynx [5]. HPV16-associated carcinogenesis is mediated by expression of the viral E6 and E7 oncoproteins, which inactivate the tumour suppressor proteins p53 and retinoblastoma; this then disrupts cell cycle regulatory pathways [6]. Therefore, the lack of p53 mutations [7] and p16 protein accumulation [8–10], which occur as a result of the loss of transcriptional repression during early tumorigenesis, are considered to be hallmarks of HPV-related HNSCC [11].

Although the frequency of high-risk HPV that is detected may be higher in samples of HNSCC, substantial heterogeneity exists among studies in terms of the detection rates. A portion of this variation may be related to differences in the incidence among geographic locations and the head and neck subsites enrolled in the included studies [12]. Additionally, it is important to consider variations in the sample sources and the collection methods as well as in the HPV detection methods. Methods for the detection of HPV DNA include in situ hybridization and polymerase chain reaction (PCR), while methods for the detection of HPV E6/E7 RNA include quantitative reverse transcriptase PCR (qRT-PCR) and RNA in situ hybridization.

To support the involvement of HPV in head and neck tumours, few studies have been conducted to determine the frequency of HPV DNA exclusively in SCC of the oral cavity, specifically in Brazil [13, 14]. Most of the

published studies have included multiple subsites of HNSCC, which have precluded the specific analysis of HPV involvement in oral carcinogenesis [15]. Furthermore, the frequency of HPV infection in oral cavity SCC exhibits much variation among studies worldwide as well in different regions within Brazil [13, 14, 16].

The aim of this study is to investigate the frequency of high-risk HPV in a large Brazilian cohort of patients with oral cavity SCC. The relevance of this study lies in our accuracy of the selection of tumour sites and in the collection of samples. We also used different HPV DNA detection methods and adopted stringent measures to prevent sample contamination, which ensures the reliability of the data.

Methods

Study subjects

This is a multicentre cross-sectional study conducted at the following two Brazilian centres: Santa Rita de Cassia Hospital and University Hospital Antonio Cassiano de Moraes, which are both located in Espírito Santo. This study was approved by the clinical centre ethics committees and by the National Commission on Ethics in Research (Protocols 318/2011 and 681/2011). Written consent was given by each patient prior to his or her participation in the study.

A total of 171 cases of oral cavity SCC that were diagnosed by histopathology between 2012 and 2015 were reviewed. The inclusion criteria included tumours from oral cavity that were diagnosed according to the International Classification of Diseases, version 10 [17] and patients who had not undergone any previous antineoplastic treatment. The anatomical subsites selected were: tongue (C02.0, C02.3, C02.8, C02.9); gum and alveolar ridge (C03.0, C03.1, C03.9); floor of the mouth (C04.0, C04.1, C04.8, C04.9); palate (C05.0, C05.8, C05.9); buccal mucosa (C06.0, C06.1); retromolar trigone (C06.2) and overlapping sites of other parts of mouth (C06.8, C06.9). 70 cases were excluded for not presenting formalin-fixed paraffin-embedded or frozen tissues available.

Following patient consent, 82 fresh tumour specimens were collected at the time of biopsy or surgical resection into RNeasy® reagent (Qiagen, Valencia, CA, USA) and stored at -80°C until further processing. In addition, 19 formalin-fixed paraffin-embedded tumours were retrieved from the pathology archive at Santa Rita de Cassia Hospital.

Clinical and pathological data (i.e., age, gender, tumour site, TNM stage, alcohol consume and tobacco exposure) were obtained by interview and from the medical records. The clinical stage of the tumours was categorized as early (clinical stages I–II) or advanced clinical stages (clinical stages III–IV), and all tumours were classified according to the TNM classification system [18].

DNA extraction and integrity

Genomic DNA was obtained from frozen tissues and from four 10 µm-thick sections cut from the paraffin blocks. Formalin-fixed paraffin-embedded sections were placed in 2 ml microcentrifuge tubes and dewaxed with multiple washes of xylene and graded solutions of 100%, 95% and 70% ethanol. After overnight digestion with sodium dodecyl sulphate (SDS) and 5% of 20 mg/ml of K proteinase (Sigma, Saint Louis, USA) at 37°C, DNA was extracted from both types of samples by standard phenol-chloroform-isoamyl alcohol and sodium acetate-ethanol precipitation. Rigorous efforts were made to avoid cross-contamination at every stage. A new microtome blade was used each time a new case was sectioned, and the components of the microtome were cleaned with xylene and ethanol after each sample was sectioned. In addition, aerosol tips were used for all pipetting steps, and separate rooms were used for pre- and post-PCR experimental steps.

DNA concentrations were estimated using a DyNA Quant 200 Fluorometer (Hoeffer Scientific, Holliston, MA, USA). To exclude false negative results derived from the degradation of DNA in samples that were over-fixed, the integrity of the DNA was assessed by amplification of a fragment of the human β-globin gene using PCO3 (5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3') and PCO7 (5'-GAAAACATCAAGGGTCCCAT-3') primers, which result in a 509-bp DNA fragment [19]. All β-globin-negative samples were excluded from further analysis.

HPV DNA detection

Nested PCR using MY09/MY11 and GP5⁺/GP6⁺ primers

The detection of high-risk HPV was performed by nested PCR to amplify a part of the HPV L1 gene, which encodes the major capsid protein of several subtypes of HPV, as previously described by Jacob in 1995 [20]. Briefly, 50 ng of DNA from each sample was amplified with the consensus primers MY09/MY11 followed by amplification with general primers GP5⁺/GP6⁺ by two-step nested PCR. Standard PCR with the

MY09/MY11 primers was performed as previously described [20, 21]. Each sample was amplified with 50 pmol each of the primers MY09 (5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3') and MY11 (5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3') in the presence of 6 mM MgCl₂ buffer, 200 mmol (each) dATP, dCTP, and dGTP, 600 mmol dUTP, and 7.5 U of Hot Start Taq DNA polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA). Then, PCR was performed using the product of the first reaction as a template in 50 mM KCl, 10 mM TrisHCl (pH 8.3), 200 mM of each deoxynucleoside triphosphate, 3.5 mM MgCl₂, 7.5 U of Hot Start Taq DNA polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA), and 50 pmol each of the GP5⁺ (5'-TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC-3') and GP6⁺ (3'-CTTATACTAAATGTCAAATAAAAAG-5') primers. Amplifications were performed in a Mastercycler Nexus (Eppendorf, Hamburg, DE) with an activation at 94°C for 7 min and 25 cycles (first step) or 15 cycles (second step) at 94°C for 45 seconds, 56°C (first step) or 46°C (second step) for 45 seconds and 72°C for 1 min. This was followed by a final extension at 72°C for 7 min, and storage at 4°C.

PGMY09/11 L1 consensus PCR

Additionally, to ensure the reliability of the data, we subjected the samples to a second round of PCR using a consensus PGMY09/11 primer set. An equimolar mixture of each primer was added to the PCR master mix for a final concentration of 10 pmol of each oligonucleotide in the primer sets; the final MgCl₂ concentration was 4 mM. Then, the PCR buffers, reagents, and amplification profiles were identical to those described by Gravitt in 2000 [21]. Cycling conditions were as follows: 95°C for 5 minutes, followed by 30 cycles at 95°C for 1 min, 57°C for 1 min, 72°C for 1 min and a 7-minute final extension period at 72°C (Mastercycler Nexus, Eppendorf, Hamburg, DE).

Positive and negative controls were used for each amplification and consisted of a previously known HPV-positive cervical carcinoma and ultrapure water, respectively. The products were then subjected to electrophoresis on an 8% polyacrylamide gel followed by a silver stain. Specimens were considered positive for HPV DNA using the MY09/MY11 and GP5⁺/GP6⁺ primer sets when they presented a 150-bp DNA fragment. This represents some of the low-risk genotypes (6, 11, 40, 42, 43, 44) or the high-risk genotypes (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68), as described by Jacobs (1995) [20]. Samples that were amplified using PGMY09/11 were considered HPV-positive if the PCR product was a 450-bp fragment.

PGMY09/11 consensus primers allowed the detection of more than 30 HPV genotypes as follows: 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, IS39, CP8304, CP6108, MM4, MM7, and MM8 [21].

DNA sequencing

PCR products were purified using the ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala, SE) and were sequenced using the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Capillary electrophoresis was performed in an ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The sequences were analysed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) available online at National Center for Biotechnology Information (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Statistical analysis

Shapiro–Wilk test was used to evaluate data normality. Variables distribution were presented by mean, standard deviation. Student t test was used to compare the mean of ages between HPV-positive and HPV-negative individuals. Multiple logistic regression was applied in order to compare HPV status, tumour size, and nodal involvement with risk factors. The level of significance adopted in all analysis was 5% with a 95% confidence interval. For the data analysis the Statistical Package for the Social Sciences, version 17 for Windows (SPSS, Chicago, USA) was used.

Results

DNA from all 19 formalin-fixed paraffin-embedded specimens produced a β -globin PCR 509-bp fragment, as did the majority of the frozen specimens (71 of 82; 85.6%). DNA from 11 frozen biopsies which presented β -globin negative were excluded from the subsequent analysis. The reasons for the exclusion were the presence of degraded and low quality DNA from tiny fragments that could not be resubmitted to DNA extraction and the existence of PCR inhibitors. Thus, the HPV status was assessed in a total of 68 males and 22 females with a mean age at diagnosis of 57.9 years (range 30-93 years; standard deviation 12.2 years) and was reported as either positive or negative. The details concerning the clinical findings and the HPV status of the cases in our

series are summarized in Table 1. Cases that exhibited HPV-positive status (3/90) were detected by nested PCR using the MY09/MY11 and GP5⁺/GP6⁺ primer sets, and the frequency of HPV infection was found to be 3.3%. Furthermore, 87 HPV-negative samples where enough DNA was present were also assessed by PGMY09/11; these samples presented a 100% concordance rate, which ensures the reliability of the previous results. The sequencing showed the presence of HPV16 in all HPV-positive cases originated from both formalin-fixed paraffin-embedded (1/19) and frozen tissues (2/71). No difference was observed considering the sample storage methods. Among the HPV-positive cases, two were heavy smokers and alcoholics males while the other was a female with no exposure to any of the known risk factors.

All HPV-positive cases were in advanced stage of the disease (III-IV) presenting tumour size (T3/T4) and lymph node metastasis (N⁺) at the time of diagnosis. Besides that, there was no significant association among HPV status and TNM stage as well as gender, alcohol consumption, tobacco use or tumour site (Table 1). The mean age of HPV-positive patients was 61.0 years, whereas the mean age of the HPV-negative patients was 57.5 years; this difference was not significant (Table 2). In addition, the most used prognostic factors tumour size and nodal involvement were not associated with alcohol consumption, tobacco use, or HPV infection. Therefore, these variables could not be considered risk or protection factors in our cohort (Tables 2 and 3).

Discussion

This study presented a cohort with a significant number of patients with oral cavity SCC. Our results demonstrate that the frequency of high-risk HPV types in oral cavity SCC is very low and is less than 4%. We believe that this result is significant, as we have assessed a precise anatomical site in our cohort. We have thus avoided bias related to the differences in the incidence of oral SCC in other sites, especially in the oropharynx where the prevalence of high-risk HPV has been reported to be high [22, 23]. Tumour sites were validated by verification of the database and the medical records; in the three HPV-positive cases, the tumours were located in the tongue and in the alveolar ridge (Table 1). In addition, rigorous efforts were taken to prevent sample contamination as previously described, which ensures the consistency of our results.

The reported prevalence of high-risk HPV DNA in oral cavity SCC varies widely. A large multicentre study reported HPV DNA in 4% of 766 oral cancers using the consensus PCR primers GP5⁺/GP6⁺ [24]. Studies performed in United Kingdom and in the United States analysed large cohorts and found an HPV frequency

of less than 2% and 5.6%, respectively [25, 26]. Moreover, in India, a study revealed an HPV infection rate of 46% in oral cavity SCC [27] while a meta-analysis published by Termine et al. (2008), in which 62 studies were analysed, revealed a 38.1% prevalence of HPV DNA in 4,852 oral squamous cell carcinoma biopsy samples [28].

In Brazil, few studies have been conducted on the frequency of HPV in oral cavity SCC, and the data presented thus far are also discordant; data show a range of 0-19.2% frequency, which is mostly related to HPV16 infection [13, 16, 29]. Table 4 illustrates some of the consistent publications in recent years that have considered the frequency of HPV infection in oral cavity SCC.

Thus, to evaluate the involvement of HPV in the genesis of oral cavity SCC, the geographic distribution of the populations should be considered. Besides, the wide variation in HPV detection rates can be influenced by other factors, such as sensitivity of the HPV testing method, the coverage of HPV genotypes in the test panel, sample collection methods as well as sample storage conditions.

The most widely applied HPV detection methods are based on the PCR amplification of viral DNA. In the current study, we have used three different standard primer sets (MY09/MY11, GP5⁺/GP6⁺ and PGMY09/11) and nested PCR to detect HPV DNA in head and neck tumours, which increases the sensitivity compared to a single PCR reaction [30]. Some advantages of the PCR methods used are the high sensitivity to detect more than 30 HPV genotypes, wide availability, and cost-effectiveness [31]. A weakness of the standard PCR-based assay is that it can not distinguish oncogenic virus from biologically irrelevant virus because is not possible to identify integrated or episomal DNA [25, 28, 32]. In addition, PCR techniques have lower specificity compared with in situ hybridization and are technically troublesome to perform.

Although it is expected that HPV detection rate by PCR is usually higher in frozen tissues, in our study we did not find difference when we compared it to formalin-fixed paraffin-embedded tumours. Thus, we suggest that the use of nested PCR, which was adopted to avoid interference of small fragments from DNA degradation during fixation procedures could contribute to this result. In addition, other studies have used both clinical specimens and have not observed differences in HPV DNA detection rates using PCR-based methods [13, 25]. Furthermore, Lopes et al., (2011) [25] report that non-quantitative PCR methods, when subject to stringent quality control measures, such as the methodology adopted in our study, are effective methods to detect HPV

DNA in those samples.

Studies have reported that patients with oral cavity SCC who do not present with a history of alcohol and tobacco consumption tend to be younger than patients who smoke and drink alcohol [16, 33]. Thus, the low frequency of HPV DNA in the present study might be related to the high mean age of our cohort, as no difference was observed between the mean age of the individuals in the HPV-positive and HPV-negative groups. Moreover, most of our cases presented with an advanced stage of the disease and a history of long and intense exposure to known risk factors. Furthermore, no differences were observed among the anatomical subsites, tumour size, presence of lymph node metastasis and TNM stage among the HPV-positive and HPV-negative cases.

Furthermore, the frequency of HPV in our study is too close to the HPV DNA rates found in healthy individuals. The natural history of HPV infection has been extensively investigated in epidemiologic studies by PCR-based methods, HPV serology and DNA/RNA in situ hybridization [25, 34]. A review about epidemiological investigation on oral HPV prevalence in healthy individuals, published by Shigeishi & Sugiyama (2016), reported that HPV frequency in saliva of healthy individuals have shown low and variable rates in a period of time, which is related to each patient's immune response and can, therefore, be inconstant. In addition, rates of oncogenic HPV infection in the oral cavity of healthy people are also known to be low (around 2%) and the natural history of HPV in this anatomical site shows HPV acquisition is a rare event compared to genital or anal infections [35, 36].

Data from a database in the USA shows a reduction in tobacco use over the last several decades [37]. Although HNSCC is closely linked to tobacco and alcohol use, its increasing incidence indicates that HPV16-related HNSCC arises in the oropharynx [24, 33, 38]. In contrast, the incidence of oral cavity SCC has declined significantly between 1973 and 2004 at a yearly rate of 1.85% [39], which suggests that HPV is not related to oral carcinogenesis. These results are reinforced by the variation in the frequency of HPV DNA, as demonstrated in this work and in other studies [40–44].

Conclusion

In conclusion, in the current study, we observed an overlapping pattern of the risk factors tobacco and alcohol; this along with the low frequency of HPV DNA, supports the evidence that HPV is not involved in the

development of oral cavity SCC in Brazilian population.

List of Abbreviations

HNSCC, Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; HPV, Human Papillomavirus; SCC, Squamous Cell Carcinoma; HR, High Risk; HPV16, Human Papillomavirus type 16; PCR, Polymerase Chain Reaction; qRT-PCR, Quantitative Reverse Transcriptase-PCR; SDS, sodium dodecyl sulphate.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the clinical centre ethics committees and by the National Commission on Ethics in Research (Protocols 318/2011 and 681/2011). All patients gave written informed consent for this study.

Consent for publication

Not applicable.

Availability of data and materials

The datasets supporting the conclusions of this article are included within the article and its supplementary information files.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Espírito Santo (FAPES award number 60929073/2013) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Bolsista CAPES – Proc. nº 11780/13-4).

Authors' contributions

SZ and PMA conceived the study and participated in its design and coordination and draft the manuscript. AC, IV and PLA carried out all laboratory experiments and helped to draft the manuscript. AS, JL, EM and JP supplied all samples and co-ordinated patient recruitment. SG and KO helped on quality control of data and

statistical analysis. MS and IL participated in the manuscript review. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We thank the Laboratório Multiusuário de Análises Biomoleculares (LABIOM - UFES) and Professor Liliana Cruz Spano for all support on HR-HPV PCR.

Authors' details

¹Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil; ²Departamento de Patologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil; ³Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil; ⁴Faculdade Católica Salesiana do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil; ⁵Programa de Prevenção e Detecção Precoce do Câncer Bucal, Setor de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Hospital Santa Rita de Cássia, Vitória, Espírito Santo, Brazil; ⁶Departamento de Patologia Oral, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

References

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin DM, Forman D, Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; 136:E359–E386.
2. Ministério da Saúde, INCA. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2014.
3. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011; 11:9–22.
4. Syrjänen KJ, Pyrhonen S, Syrjänen SM, Lamberg MA. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg*. 1983; 21:147–153.
5. IARC. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. v 90. França: IARC; 2007.

6. Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head Neck Oncol.* 2009; 1:1–22.
7. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2008; 14:366–369.
8. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, H H, Wolf GT, Urba SG, Chepeha DB, Teknos TN, Tsien CI, Taylor JMG, Silva NJD, Yang K, M D, Bauer J a, Bradford CR, Carey TE. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *Clin Oncol.* 2008; 26:3128–3137.
9. O'Regan EM, Toner ME, Finn SP, Fan CY, Ring M, Hagmar B, Timon C, Smyth P, Cahill S, Flavin R, Sheils OM, O'Leary JJ: p16INK4A genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Pathol* 2008; 39:452–458.
10. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A. Molecular Classification Identifies a Subset of Human Papillomavirus – Associated Oropharyngeal Cancers With Favorable Prognosis. *J Clin Oncol.* 2006; 24:736–747.
11. Mroz EA, Baird AH, Michaud WA, Rocco JW. COOH-terminal binding protein regulates expression of the p16INK4A tumor suppressor and senescence in primary human cells. *Cancer Res.* 2008; 68:6049–6053.
12. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol biomarkers Prev.* 2005; 14:467–475.
13. López RVM, Levi JE, Eluf-Neto J, Koifman RJ, Koifman S, Curado MP, Michaluart-Junior P, Figueiredo DLA, Saggioro FP, de Carvalho MB, Kowalski LP, Abrahão M, de Góis-Filho F, Tajara EH, Waterboer T, Boffetta P, Brennan P, Wünsch-Filho V. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. *Cancer Causes Control.* 2014; 25:461–71.
14. Soares RC, Oliveira MC, Souza LB, Costa AL, Medeiros SRB, Pinto LP. Human papillomavirus in oral

- squamous cells carcinoma in a population of 75 Brazilian patients. *Am J Otolaryngol.* 2007; 28:397–400.
15. Paolini F, Rizzo C, Sperduti I, Pichi B, Mafera B, Rahimi SS, Vigili MG, Venuti A. Both mucosal and cutaneous papillomaviruses are in the oral cavity but only alpha genus seems to be associated with cancer. *J Clin Virol.* 2013; 56:72–76.
16. Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, Nishimoto IN, Rocha R, Kowalski LP. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int J Cancer.* 2012; 130:1726–32.
17. World Health Organization. International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems. Tenth Revision. 2nd ed. v 2. Geneva: WHO; 2004.
18. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM : Classification of Malignant Tumours.* 7th ed. Oxford: Wiley-Blackwell; 2009.
19. Husman ADR, Snijders PJF, Stell H V, Brulel AJC Van Den, Meijer C. Processing of long-stored archival cervical smears for human papillomavirus detection by the polymerase chain reaction. *Br J Cancer.* 1995; 72:412–417.
20. Jacobs MV, De Roda Husman AM, Van den Brule AJC, Snijders PJF, Meijer CJLM, Walboomers JMM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 1995; 33:901–905.
21. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ. Improved Amplification of Genital Human Papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:357–361.
22. Machado J, Reis PP, Zhang T, Simpson C, Xu W, Perez-Ordóñez B, Goldstein DP, Brown DH, Gilbert RW, Gullane PJ, Irish JC, Kamel-Reid S. Low prevalence of human papillomavirus in oral cavity carcinomas. *Head Neck Oncol.* 2010; 2:1–6.
23. St Guily JL, Jacquard AC, Prétet JL, Haesebaert J, Beby-Defaux A, Clavel C, Agius G, Birembaut P, Okaïs C, Léocmach Y, Soubeyrand B, Pradat P, Riethmuller D, Mougin C, Denis F. Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France-The EDiTH VI study. *J Clin Virol.* 2011; 51:100–

104.

24. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernández L, Idris A, Sánchez MJ, Neto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJF, Meijer CJLM, Viscidi R, Muñoz N, Franceschi S. Human Papillomavirus and Oral Cancer: The International Agency for Research on Cancer Multicenter Study. *J Natl Cancer Inst.* 2003; 95:1772–1783.

25. Lopes V, Murray P, Williams H, Woodman C, Watkinson J, Robinson M. Squamous cell carcinoma of the oral cavity rarely harbours oncogenic human papillomavirus. *Oral Oncol.* 2011; 47:698–701.

26. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, Perez-Ordóñez B, Jordan RC, Gillison ML. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2013; 49:1–8.

27. Chakrobarty B, Roy JG, Majumdar S, Uppala D. Relationship among tobacco habits, human papilloma virus (HPV) infection, p53 polymorphism/mutation and the risk of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014; 18:211–216.

28. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, Campisi G. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: A meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol.* 2008; 19:1681–1690.

29. Spíndula-Filho JV, Cruz AD, Oton-Leite AF, Batista AC, Leles CR, Alencar R de CG, Saddi VA, Mendonça EF. Oral squamous cell carcinoma versus oral verrucous carcinoma: an approach to cellular proliferation and negative relation to human papillomavirus (HPV). *Tumor Biol.* 2011; 32:409–416.

30. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, Stisser K, König R, Tying SK. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5 +/6 + primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods.* 2004; 122:87–93.

31. Cantley RL, Gabrielli E, Montebelli F, Cimbaluk D, Gattuso P, Petruzzelli G. Ancillary studies in determining human papillomavirus status of squamous cell carcinoma of the oropharynx: a review. *Patholog Res Int.* 2011; 2011:1–7.

32. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho C-H, Lippman SM, Tsao AS. 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 Oncol.* 2010; 2:1–11.
33. Marur S, Souza GD, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer : a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010; 11:781–789.
34. Lee LA, Huang CG, Liao CT, Lee LY, Hsueh C, Chen TC, Lin CY, Fan KH, Wang HM, Huang SF, Chen IH, Kang CJ, Ng SH, Yang SL, Tsao KC, Chang YL, Yen TC. Human papillomavirus-16 infection in advanced oral cavity cancer patients is related to an increased risk of distant metastases and poor survival. *PLoS One.* 2012; 7:7–9.
35. Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Lin H-Y, Fulp W, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Hildesheim A, Villa LL, Salmerón JJ, Lazcano-Ponce E, Giuliano AR. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet.* 2013; 382:877–887.
36. Shigeishi H, Sugiyama M. Risk Factors for Oral Human Papillomavirus Infection in Healthy Individuals: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Med Res.* 2016; 8:721–729.
37. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruze S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011; 29:4294–4301.
38. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klusmann JP, Lee JH, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer.* 2004; 108:766–772.
39. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008; 26:612–619.
40. Attner P, Du J, Näsman A, Hammarstedt L, Ramqvist T, Lindholm J, Marklund L, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus and survival in patients with base of tongue cancer. *Int J Cancer.* 2011;

1
2 128:2892–2897.
3

4
5 41. Termine N, Giovannelli L, Rodolico V, Matranga D, Pannone G, Campisi G. Biopsy vs. brushing:
6 comparison of two sampling methods for the detection of HPV DNA in squamous cell carcinoma of the oral
7 cavity. *Oral Oncol.* 2012; 48:870–875.
8
9

10
11 42. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Pawlita M, Turek LP. Complex etiology underlies risk and
12 survival in head and neck cancer human papillomavirus, tobacco, and alcohol: A case for multifactor disease.
13 *J Oncol.* 2012; 2012:1–9.
14
15

16
17 43. Duray A, Descamps G, Decaestecker C, Remmelink M, Sirtaine N, Lechien J, Ernoux-Neufcoeur P,
18 Bletard N, Somja J, Depuydt CE, Delvenne P, Saussez S. Human papillomavirus DNA strongly correlates
19 with a poorer prognosis in oral cavity carcinoma. *Laryngoscope.* 2012; 122:1558–1565.
20
21

22
23 44. González-Ramírez I, Irigoyen-Camacho ME, Ramírez-Amador V, Lizano-Soberón M, Carrillo-García A,
24 García-Carrancá A, Sánchez-Pérez Y, Méndez-Martínez R, Granados-García M, Ruíz-Godoy LM, García-
25 Cuellar CM. Association between age and high-risk human papilloma virus in Mexican oral cancer patients.
26 *Oral Dis.* 2013; 19:796–804.
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Tables

Table 1 Association of clinical findings and HPV status in oral cavity SCC (n = 90).

	HPV				OR (Adjusted)	95% CI	p-value**
	Positive		Negative				
	n	(%)	n	(%)			
Gender							
Male	2	(66.6)	66	(75.9)	1	-	-
Female	1	(33.4)	21	(24.1)	3.023	(0.135 - 67.544)	0.485
Tumour site							
Tongue	2	(66.7)	47	(54.0)	1,07E+08	0	0.988
Floor of the mouth	0	(0.0)	22	(25.3)	1	-	-
Others ^a	1	(33.3)	18	(20.7)	2,07E+08	0	0.998
Alcohol Consumption							
No	1	(33.3)	37	(43.0)	1	-	-
Yes	2	(66.7)	49	(57.0)	2.446	0	0.637
Tobacco Consumption							
No	1	(33.3)	39	(45.3)	1	-	-
Yes	2	(66.7)	47	(54.7)	1.993	(0.045 - 88.793)	0.722
TNM Stage							
I/II	0	(0.0)	28	(32.9)	1	-	-
III/IV	3	(100.0)	57	(67.1)	1,30E+08	0	0.998

Reference category of the dependent variable - HPV negative;

OR - Odds Ratio; CI - Confidence interval; **. Multiple logistic regression (Adjusted to all variables)

^aPalate, retromolar trigone, gum, buccal mucosa, alveolar ridge.

Data unknown: alcohol consumption - 1; tobacco consumption - 1; TNM stage - 2.

Table 2 Comparison of the ages of the patients with HPV-positive and HPV-negative oral cavity SCC.

HPV	n	Mean	STD ^b	CI (95%)	p
Negative	87	57.5	12.0	54.91-60.09	0.63 ^a
Positive	3	61.0	16.0	46.00-79.00	

^aStudent t test.^bSTD, Standard deviation.

Table 3 Association of prognostic features and the risk factors (n = 90).

	Tumour Size			OR (Adjusted)	95% CI	p-value **	Nodal Involvement ^a			OR (Adjusted)	95% CI	p-value**	
	T1/T2		T3/T4				N0		N+				
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)					
HPV status													
Negative	36	(100.0)	48	(94.1)	1	-	-	48	(100.0)	36	(92.3)	1	-
Positive	0	(0.0)	3	(5.9)	1.18E+09	0	0.999	0	(0.0)	3	(7.7)	2.04E+09	0.999
Alcohol Drinkers													
No	16	(44.4)	21	(42.0)	1	-	-	21	(44.7)	16	(41.0)	1	-
Yes	20	(55.6)	29	(58.0)	0.708	(0.243 - 2.060)	0.526	26	(55.3)	23	(59.0)	0.626	(0.209 - 1.180)
Tobacco Users													
No	19	(52.8)	19	(38.0)	1	-	-	25	(53.2)	13	(33.3)	1	-
Yes	17	(47.2)	31	(62.0)	2.173	(0.751 - 6.290)	0.152	22	(46.8)	26	(66.7)	2.947	(0.977 - 8.887)

Reference category of the dependent variable Tumor size - T1/T2; Reference category of the dependent variable Nodal Involvement- N0; OR - Odds Ratio;

CI - Confidence Interval; **. Multiple logistic regression (Adjusted to all variables);

^aN0 - absence of lymph node metastasis; N+ - lymph node metastasis;

Data unknown: alcohol drinkers - 1; tobacco users - 1; tumour size - 3; nodal involvement - 3.

Table 4 Prevalence of HPV in oral cavity SCC.

<i>Author / Year</i>	<i>Country</i>	<i>No. of cases</i>	<i>HPV (%)</i>	<i>Samples</i>	<i>Methods</i>
Kaminagakura et al. [16] 2012	Brazil	114	19.2	FFPE	GP5 ⁺ /GP6 ⁺
Attner et al. [40] 2011	Sweden	87	78.0	FFPE	GP5 ⁺ /GP6 ⁺
Lopes et al. [25] 2011	United Kingdom	118	<2.0	FT/FFPE	GP5 ⁺ /GP6 ⁺
Termine et al. [41] 2012	Italy	83	12.1	FFPE	Nested PCR ^a PGMY09/11
Smith et al. [42] 2012	USA	170	9.4	FFPE	GP5 ⁺ /GP6 ⁺ PGMY09/11
Lee et al. [34] 2012	Taiwan	173	38.0	FFPE	MY11/GP6 ⁺
Duray et al. [43] 2012	Belgium	147	44.2	FFPE	GP5 ⁺ /GP6 ⁺
Lingen et al. [26] 2013	USA	409	5.9	FFPE	SPF10
González-Ramírez et al. [44] 2013	Mexico	80	5.0	FT	Nested PCR ^a
Lopez et al. [13] 2014	Brazil	121	6.6	FT/FFPE	PGMY09/11
Chakrobarty et al. [27] 2014	India	83	46.0	FT	MY09/MY11

^aNested PCR, MY09/11 and GP5⁺/GP6⁺.^bFT, frozen tissue.

Manuscrito 2 - Human Papillomavirus E6/E7 mRNA detection by *in situ* hybridization in oral cavity squamous cell carcinoma

O manuscrito intitulado “Human Papillomavirus E6/E7 mRNA detection by *in situ* hybridization in oral cavity squamous cell carcinoma” foi submetido para avaliação ao periódico *Archives of Oral Biology* em 08 de janeiro de 2020, conforme figura 17, e aceito para publicação em 01 de maio de 2020. Na submissão, a classificação de acordo com o Qualis CAPES era B2 na área de Biotecnologia (Figura 17), e atualmente a classificação é A1 de acordo com o novo Qualis CAPES,



[Sandra von Zeidler](#) | [My Journals](#) | [Log Out](#) | [Help](#)

A

Note: This site will be unavailable from the 13th-15th January while we migrate to Editorial Manager. [Click here for more details](#)

Home
Reports

My Author Tasks

Start New Submission

Click [here](#) to view your submissions with a final decision

My Submissions with Journal (1)

Human Papillomavirus E6/E7 mRNA detection by *in situ* hybridization in oral cavity squamous cell carcinoma

Current status: With Editor (08/Jan/2020)

AOB_2019_1170

Editor-in-Chief: Gordon Proctor

Article Type: Research Paper

Initial submission : 08/Jan/2020

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
0003-9969	ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY	BIOTECNOLOGIA	B2
1879-1506	ARCHIVES OF ORAL BIOLOGY	BIOTECNOLOGIA	B2

« Início
« Anterior
1
Próxima »
Fim »

1 a 2 de 2 registro(s)













Figura 17. Comprovante de submissão do artigo “Human Papillomavirus E6/E7 mRNA detection by *in situ* hybridization in oral cavity squamous cell carcinoma” para o periódico Archives of oral biology (A) e Classificação no Qualis Capes, na área de Biotecnologia (B).



Human Papillomavirus E6/E7 mRNA detection by in situ hybridization in oral cavity squamous cell carcinoma

Priscila Marinho Abreu^a, Isabella Bittencourt Valle^b, Thabata Coeli Dias Damasceno^a, Anna Clara Gregório C6^a, Paola Fernandes Pansini^a, José Roberto Vasconcelos Podestá^c, Evandro Duccini Souza^c, Ricardo Mai Rocha^c, Maria Paula Curado^d, Hisham Mehanna^e, Sandra Vantorin von Zeidler^{a, *}

^a Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^c Programa de Prevenção e Detecção Precoce do Câncer Bucal, Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Hospital Santa Rita de Cássia, Vitória, Espírito Santo, Brazil

^d Centro Internacional de Pesquisa, AC Camargo Cancer Center, São Paulo, São Paulo, Brazil

^e Institute of Head and Neck Studies and Education, University of Birmingham, Birmingham, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

High risk human papillomavirus
Head and neck cancer
RNA in situ hybridization
HPV-driven cancer

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the application of in situ hybridization using E6/E7 mRNA probes to identify the frequency of high-risk HPV transcriptionally active and the use of HPV status as a prognostic biomarker in oral cavity squamous cell carcinoma (OCSCC).

Methods: Ninety-nine OCSCC samples were evaluated from Hospital Santa Rita de Cassia, Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes and University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust. After tissue microarray construction, the slides were submitted to an in situ hybridization detection method for HPV E6/E7 mRNA. HPV status was designated a binary classification. Multiple logistic regression examined the association of HPV with clinical features and other risk factors, using SPSS® software. For all hypothesis tests, a significance level of $p \leq 0.05$ was considered.

Results: HPV frequency in oral squamous cell carcinoma was 8 %. There was no association between HPV and clinical variables and between the main prognostic features and known risk factors. There was no difference in the prevalence of HPV for oral cavity squamous cell carcinoma by geography (Brazil vs UK).

Conclusions: A low frequency of E6/E7 mRNA by RNA in situ hybridization was found in oral cavity squamous cell carcinoma, which supports the evidence that HPV-driven cancer of the oral cavity is uncommon.

1. Introduction

Human papillomavirus (HPV) is an established cancer risk factor for a subset of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Considered a distinct entity in oropharyngeal squamous cell carcinoma, HPV-positive tumours show better responses to therapeutic modalities and better overall and disease-free survival, reflecting a more favourable prognosis, compared to HPV-negative tumours (Ang et al., 2010; Ukpo et al., 2011).

Although some studies have revealed presence of HPV DNA in oral cavity squamous cell carcinoma (OCSCC) (Hauck et al., 2015; Hubbers & Akgul, 2015; Termine et al., 2008), viral participation on oral carcinogenesis remains unclear, due to the lack of molecular evidence. The presence of HPV DNA does not mean that the virus is biologically active. Some studies associate oral cavity tumour development with chronic inflammatory processes induced by the virus, as a result of inflammation stimulus by activation of cellular response to eliminate pathogens, producing cytokines, chemokines, prostaglandins,

Abbreviations: HPV, Human papillomavirus; OCSCC, oral cavity squamous cell carcinoma; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; TMA, tissue microarray; OS, Overall Survival; DFS, Disease-Free Survival; ISH, in situ hybridization; FFPE, Formalin-Fixed paraffin-embedded.

* Corresponding author at: Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Espírito Santo, Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe, Vitória, ES, ZIP Code 29.040-090, Brazil.

Email addresses: priscilamarinho84@gmail.com (P.M. de Abreu); isabellabdv@gmail.com (I.B. do Valle); thabata.damasceno@gmail.com (T.C.D. Damasceno); annaclarage@gmail.com (A.C.G. C6); paolafpansini@gmail.com (P.F. Pansini); podestajr@gmail.com (J.R.V. de Podestá); evandroduccini@terra.com.br (E.D. de Souza); ricardomai@gmail.com (R.M. Rocha); mp.curado@accamargo.org.br (M.P. Curado); h.mehanna@bham.ac.uk (H. Mehanna); sandra.zeidler@ufes.br (S.V. von Zeidler)

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104746>

Received 8 January 2020; Received in revised form 23 January 2020; Accepted 1 May 2020

Available online xxx

0003-9969/© 2020.

growth factors and other molecular signals. Those signals provide a propitious environment to accumulate mutations in epithelial cells, which contributes to cellular proliferation and migration viability. In addition to being independently associated with HNSCC, chronic inflammation may have a synergistic effect with other carcinogens, increasing the risk of cancer (Hubbers & Akgul, 2015; Tezal, 2012).

HPV-induced carcinogenesis is associated with the loss of cell-cycle regulation frequently observed in persistent high-risk oncogenic HPV infections. In these persistent infections, the viral DNA that should remain in episomal form integrates into the host cell DNA. During this step, the viral DNA is cleaved in the E1/E2 gene region, which affects the transcriptional control exerted by E2. Since the E2 gene product is responsible for E6 and E7 oncogenes transcription regulation, loss of control leads to increased expression of these oncoproteins. E6 binds to p53 protein, a tumour suppressor gene that induces apoptosis pathways and repairs DNA damage, promoting its degradation by the proteasome. E7 binds to pRB, inhibiting its activity and releasing the transcription factor E2F, which promotes DNA replication and cell proliferation. Inactivation of pRB leads to overexpression of p16, expression of which is controlled by negative feedback by pRB. Furthermore, E6 oncoprotein can activate telomerase expression, which results in a cell with unlimited replicative potential. Therefore, E6 and E7 proteins have a crucial role on HPV-induced carcinogenesis (Ferraz, Beatriz, Santos, & Discacciati, 2012; Hanahan, Weinberg, & Francisco, 2000; Oguejiofor et al., 2013; Pannone et al., 2012; Simonato & Miyahara, 2007; Souto, 2005).

In this context, the TNM Classification of Malignant Tumours 8th edition, which is the staging system published by the Union for International Cancer Control in 2017 (Brierley, Gospodarowicz, & Wittekind, 2017), included in the staging of oropharyngeal tumours, HPV status as a prognostic factor, as determined by expression of p16 protein. The increase of the p16 protein detected by immunohistochemistry (IHC) is a surrogate marker to HPV presence. This classification has been validated only for oropharynx and does not include oral cavity tumours (Brierley et al., 2017). In addition, it is estimated that approximately 20 % of the p16-positive tumours may not be HPV-positive, and may not be sufficient to detect biologically relevant HPV infection or even confirm the presence of HPV in these tumours (Mills, Dirks, Poulter, Mills, & Stoler, 2017; Nauta et al., 2018).

Based on this fact, the use of RNA-based reverse transcriptase (RT)-PCR currently has been considered the gold standard for HPV detection. It allows E6/E7 mRNA detection, demonstrating that HPV is not simply present in the tumour, but is biologically relevant and transcriptionally active, playing a role in carcinogenesis. However, in order to access the nucleic acids, the tissue architecture is destroyed, and technical expertise are required.

Thus, recently, a technology based on in situ hybridization using RNA probes (RNAscope®) has emerged as a more sensitive technique to identify mRNA from E6 and E7 oncogenes, using Formalin-Fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue, which is already used in routine clinical practice. Besides, the tissue context is preserved, allowing the exact location of the infected cell. In addition, the interpretation could be performed by pathologists with a light microscope (Mirghani et al., 2015; Wang et al., 2012).

The aim of this study was to evaluate the application of the technique of in situ hybridization, using E6/E7 mRNA probes to identify the frequency of high-risk HPV transcriptionally active in OCSCC and its application as a prognostic marker.

2. Materials and methods

2.1. Patients

This is a multicentric observational longitudinal prospective analytical study conducted at two Brazilian centres, Hospital Santa Rita de Cassia and Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, both located in Espírito Santo, and University Hospitals Coventry & Warwickshire, located in the United Kingdom. This study was approved by the clinical centre ethics committees and by the National Commission on Ethics in Research (Centro Integrado de Atenção à Saúde, Vitória, ES - Process 318/2011; and NRES Committee West Midlands – Coventry & Warwickshire - EC.10.H1210.9). Each patient gave written consent prior to their participation in the study.

Ninety-nine cases of OCSCC diagnosed between 2011 and 2015 were enrolled in this study, consisting of 51 cases from Brazil and 48 from United Kingdom. The inclusion criteria were patients who had not undergone any previous antineoplastic treatment and had at least 24 months follow-up or death. During follow-up, data such as treatment response and relapse were analysed. Oral cavity classified in subsites according to the International Classification of Diseases (ICD-10) version 10 as follows: tongue (C02.0-C02.3, C02.8, C02.9), gingiva (C03.0, C03.1, C03.9), floor of mouth (C04.0, C04.1, C04.8, C04.9), hard palate (C05.0), cheek (C06.0), vestibule of the mouth (C06.1) and retromolar area (C06.2).

Clinical and pathological data (i.e., age, gender, tumour subsite, TNM stage, alcohol consumption and tobacco exposure) were obtained by interview and from the medical records. The clinical stage of the tumours was categorized as early (stages I and II) or advanced (stages III and IV), and all tumours were classified according to the TNM classification system 8th edition (Brierley et al., 2017). Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumour blocks were retrieved from the Pathology archives at centres and all cases were reviewed by an experienced pathologist.

2.2. Tissue microarray

Hematoxylin and eosin (HE) stained slides were scanned on the Panoramic Digital Slide Scanner platform (3DHISTECH Ltd., Hungary), and the images were assessed using the Panoramic Viewer software for Windows (version 1.15 3DHISTECH Ltd., Hungary). Three of representative tumour areas were selected for each case using the TMA tool from the Panoramic Viewer software. Then, the donor blocks were inserted into the TMA Master II (3DHISTECH Ltd., Hungary) and scanned. Slides images with selected TMA areas were aligned to images of the blocks using TMA Master II software (3DHISTECH Ltd., Hungary). Cylindrical fragments with 0.6 mm of diameter were obtained and 1 mm thick cylindrical fragments were removed and inserted into a receptor block in an automated system (TMA Master II, 3DHISTECH Ltd., Hungary) at the Nottingham Health Science Biobank, UK. Subsequently, receptor blocks were sectioned on a microtome to obtain 3 µm thick sequential histological sections arranged on polarized slides (StarFrost® Advanced Polycat, Braunschweig, Germany).

A validation set was performed to assess correspondence among whole section staining and TMA core staining. For validation, a whole section from 10 tumours was stained and scored, then, scores of whole sections and their corresponding TMA cores were compared. After method validation, the TMA was adopted due to its advantages, such as uniformity of reactions, time saving and uniform optimization of the use of antibodies, reagents and tissues.

2.3. RNA-ISH for high-risk - HPV mRNA

Detection of high-risk HPV E6/E7 mRNA was performed using the HR-HPV RNAscope® version 2.0 (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA) according to manufacturer's instructions. TMA sections were deparaffinized, pre-treated with heat and protease before hybridization with target-specific probes for the E6 and E7 genes of seven high-risk HPV genotypes (HPV-16, -18, -31, -33, -35, -52 and -58). Ubiquitin C (UBC, a constitutively expressed endogenous gene) and a bacterial gene (dapB) were used as positive and negative reaction controls, respectively. A slide with HeLa cells was used as HPV positive control. After incubation with preamplifier, amplifier and label probe, TMA sections were incubated with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) and counterstained with Gill's Haematoxylin.

2.4. Microscopic evaluation

Two pathologists were trained, and the calibration was executed by scoring three test TMAs, with a minimum agreement level of 80 % between observers.

RNA-ISH for high-risk HPV was scored in 40× magnification using a binary classification (positive vs. negative). Punctate brown staining, located in cytoplasm and/or nucleus and present in at least one tumour cell core, was identified as positive staining. HeLa cells were used as reference for positive staining for high-risk HPV, and the dapB-stained slides as reference for no staining (Mirghani et al., 2016).

Positive control staining (UBC) was considered adequate if it showed a strong staining in more than 75 % of cells in the section, while negative control (dapB) was considered adequate if negative or weak staining were found. Otherwise (UBC < 5 dots per cell), the sample was classified as having insufficient RNA quality.

2.5. Statistical analysis

The statistical software SPSS version 20 for Windows (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, USA) was used for data analysis. The Chi-square and Fisher's exact probability tests were used to compare clinicopathological characteristics according to HPV detection and probability of survival, recurrence or death. Overall Survival (OS) and Disease-Free Survival (DFS) were estimated and compared using

the Kaplan-Meier method and log-rank tests, respectively. The acceptable level of statistical significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

HPV status was assessed in 77 men and 22 women, with a mean age of diagnosis of 60.5 years (range 32–98 years; standard deviation 12.55 years). The details concerning the clinical features and the HPV status of the evaluated cases are summarized in Table 1.

HPV positivity was identified in 8 % of the samples (8/99) using RNA in situ hybridization, indicating the presence of transcriptionally active high-risk HPV. The profiles assessed in this study are depicted in Fig. 1. Of these, the majority were men (6 out of 8, 75 %), current smokers (6 out of 6, 100 %) and alcohol consumers (5 of 6, 83.3 %). The oral tongue was the most frequent HPV-positive subsite (6 of 8, 75 %). Advanced clinical staging without relapse (5 of 8, 62.5 %) was predominant in HPV-positive tumours.

In addition, there was no significant association between HPV status and gender, tumour subsite, TNM stage, alcohol and tobacco consumption, death or relapse (Table 1). The prognostic variables, such as tumour size and nodal involvement, were not associated with HPV status or alcohol and tobacco consumption. Thus, these known risk factors were not associated with T and N OCSCC staging in this study (Table 2). Considering the origin of the samples, no differences were observed in the prevalence of HPV for oral cavity squamous cell carcinoma from Europe (UK) and Latin America (Brazil). The OS and DFS p-log rank, obtained using the Kaplan-Meier method and log-rank tests, were 0.892 and 0.954, respectively (Fig. 2). Therefore, the survival analysis indicated that HPV was not related to overall or disease-free survival and, therefore, could not be considered a prognostic biomarker in OCSCC.

4. Discussion

In this study, the frequency of biologically active HPV infection in OCSCC was 8 % detected by E6 and E7 oncoprotein mRNA. Although the HPV frequency in this study is low, when compared to our previous one (Abreu et al., 2018), we observed a higher frequency of virus detection using mRNA-ISH in an anatomical site where HPV-causation is considered unusual. In our previous studies, HPV DNA from OCSCC assessed by polymerase chain reaction showed a frequency lower than

Table 1
HPV detection by RNA in situ hybridization and its association with clinical features and risk factors.

Clinical Features		Negative		Positive		OR (Adjusted)	95 % CI	p-value**
		n	(%)	n	(%)			
Gender	Male	71	78.02	6	75.00			
	Female	20	21.98	2	25.00	2.20	(0.12–39.78)	0.592
Tumour Site	Tongue	66	72.53	6	75.00	0.85	(0.05–13.55)	0.910
	Floor of mouth	8	8.79	1	12.50	3.40	(0.08–139.24)	0.518
	Others*	17	18.68	1	12.50	1.00	–	–
TNM Stage	I/II	38	43.68	3	37.50	1.60	(0.11–24.26)	0.734
	III/IV	49	56.32	5	62.50	1.00	–	–
Tobacco consumption	Yes (former/current)	58	81.69	6	100.00	1.00	–	–
	No	13	18.31	0	0.00	0.00	0	0.999
Alcohol consumption	Yes (former/current)	42	68.85	5	83.33	1.00	–	–
	No	19	31.15	1	16.67	0.80	(0.04–16.41)	0.885
Death	Yes	40	45.98	4	50.00	1.00	–	–
	No	47	54.02	4	50.00	1.64	(0.14–19.21)	0.696
Relapse	Yes	28	36.36	3	37.50	1.06	(0.09–12.81)	0.965
	No	49	63.64	5	62.50	1.00	–	–

Reference category of the dependent variable HPV -.

OR, Odds Ratio; CI, Confidence Interval; *Multiple logistic regression (Adjusted to all variables).

*Gingiva, hard palate, cheek, vestibule of the mouth and retromolar area.

Unknown Data: TNM stage - 4; Tobacco consumption - 22; Alcohol consumption - 32; Death - 4; Relapse - 14.

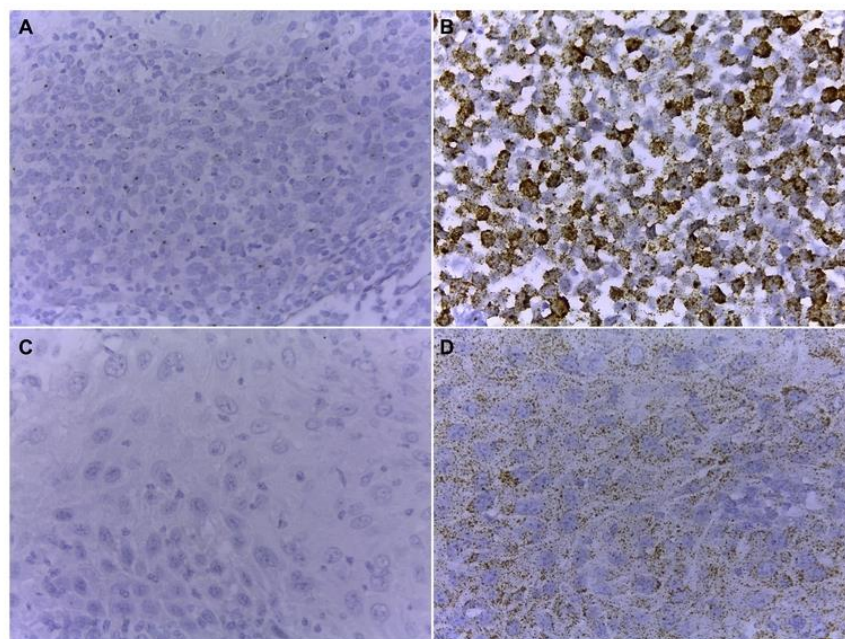


Fig. 1. RNA in situ hybridization for E6/E7 mRNA detection in oral cavity squamous cell carcinoma. Positive HPV E6/E7 mRNA ISH, with punctate, brown, nuclear and cytoplasmic staining (A). RNA ISH in HeLa Cells (HPV control) confirms the E6/E7 mRNA detection effectiveness (B). Dihydrodipicolinate reductase (dapB) ISH (negative control) showing no staining (C). Ubiquitin C (Ubc) ISH (positive control) confirms RNA quality (D). Original magnification: 40 $\times$.

3 %, reflecting the wide worldwide frequency variation in these tumours (Abreu et al., 2018; Mehanna et al., 2012).

HPV frequency has been found to be quite varied in the oral cavity. For example, HPV frequency in the oral cavity of healthy individuals varies from 2 to 8 %, with a higher prevalence in men than in women, and strongly related to sexual behaviour, immunodeficiency and smoking habits (Hubbers & Akgul, 2015; Shigeishi & Sugiyama, 2016). In potentially malignant oral disorders, studies report an HPV positivity increase in relation to healthy individuals, with a frequency of 20–64 %, while oral cancer shows a wide variation. This could indicate HPV infection as a potential etiological factor of these oral disorders and cancer (Chen & Zhao, 2017; Hubbers & Akgul, 2015; McCord et al., 2013; Syrjänen et al., 2011).

In addition, HPV-positive oral cancer does not have a better prognosis than HPV-negative oral cancer unlike oropharyngeal cancer. Thus, either the mechanism of HPV causation is different or current treatment is not better in HPV-positive than in HPV-negative tumours, which could explain the HPV frequency variation between oral and oropharyngeal cancer. In part, this could be related to the use of varied detection methodologies, considering that most of these studies applied DNA-based HPV detection techniques.

The in situ hybridization technique using RNA probes, applied in this study, can detect a transcriptionally active HPV, through E6/E7 mRNA detection in FFPE tissue. Thus, the application in slides with tissue sections makes HPV detection simpler in comparison to the gold standard, qRT-PCR (Ukpo et al., 2011).

Studies have reported high sensitivity and specificity for HPV detection by ISH-RNA. Schache et al. demonstrated 97 % sensitivity and 93 % specificity comparing it with qRT-PCR as reference method (Schache et al., 2013). Ukpo and colleagues reported agreement of more than 96 % between strong p16 staining and HPV RNA-ISH in the evaluated oropharyngeal tumours. HPV DNA-ISH was also used by this group, with 15.4 % of cases being DNA-ISH negative but RNA-ISH positive. Also, 2 cases were DNA-ISH positive but RNA-ISH negative, which

may indicate a non-active transcriptional HPV (Ukpo et al., 2011). Bishop and colleagues reported high concordance rate among p16 expression, HPV DNA-ISH and RNA-ISH (Bishop et al., 2012). Thus, HPV detection by RNA-ISH has been shown to be a good alternative for HPV detection, with high sensitivity and specificity, in addition to agreement with p16 expression, which has already been used for oropharyngeal tumour staging (Brierley et al., 2017).

The main importance of this technique is the applicability in clinical routine, since FFPE tissue is already used in clinical practice, making it possible to compare molecular and histopathological information and improve data interpretation (Wang et al., 2012). However, it is still a costly technique. In our study, the cost was reduced by using tissue microarray, allowing evaluation of several samples on a single slide. RNAscope® shows several advantages besides clinical routine application, such as: tissue preservation, which allows a morphological correlation (1); direct RNA visualization in FFPE tissue (2); high sensitivity to single RNA molecules and single cell resolution, allowing highly sensitive and specific in situ RNA analysis of any biomarker in a routine clinical sample (3); identification of transcriptionally active HPV, that is, a biologically relevant HPV infection (4); amplifies specific studied target signals without amplifying the background, showing a result with less noise and nonspecific staining (5). RNAscope® technology represents a significant advance in the methodology of in situ hybridization using RNA probes (Bishop et al., 2012; Schache et al., 2013; Ukpo et al., 2011; Volpi et al., 2018; Wang et al., 2012, 2014).

5. Conclusions

This study represents the first implementation of the E6/E7 mRNA by RNA in situ hybridization in Latin America (Brazil), which proved to be a promising technique for the detection of high biologically active HPV. In addition, we observed a low frequency of E6/E7 mRNA by RNA in situ hybridization in the analysed population, which indicates a low frequency of transcriptionally active HPV in OSCC. This re-

Table 2

Association of prognostic features and risk factors.

		Tumour size				OR (Adjusted)	95 % CI	p-value**	Nodal involvement				OR (Adjusted)	95 % CI	p-value**	
		T1/T2		T3/T4												
		N	(%)	n	(%)					n	(%)	n	(%)			
HPV status	Negative	49	90.74	38	92.68	1.00	–	–		53	92.98	29	87.88	1.00	–	–
	Positive	5	9.26	3	7.32	0.74	(0.09–5.78)	0.770		4	7.02	4	12.12	1.20	(0.10–14.53)	0.884
Tobacco consumption	Yes (former/current)	30	76.92	33	91.67	1.00	–	–		39	84.78	21	80.77	1.00	–	–
	No	9	23.08	3	8.33	0.00	0	0.999		7	15.22	5	19.23	0.80	(0.15–4.26)	0.797
Alcohol consumption	Yes (former/current)	21	63.64	25	75.76	1.00	–	–		29	70.73	16	69.57	1.00	–	–
	No	12	36.36	8	24.24	0.88	(0.24–3.15)	0.842		12	29.27	7	30.43	0.98	(0.28–3.44)	0.970

Reference category of the dependent variable Tumour size - ; Reference category of the dependent variable Nodal involvement -.

OR Odds Ratio, CI Confidence Interval; **Multiple logistic regression (Adjusted to all variables).

^aN0 - absence of lymph node metastasis; N+ - lymph node metastasis.

Unknown data: Tumour size - 4; Tobacco consumption - 22; Alcohol consumption - 32; Death - 4; Relapse - 14.

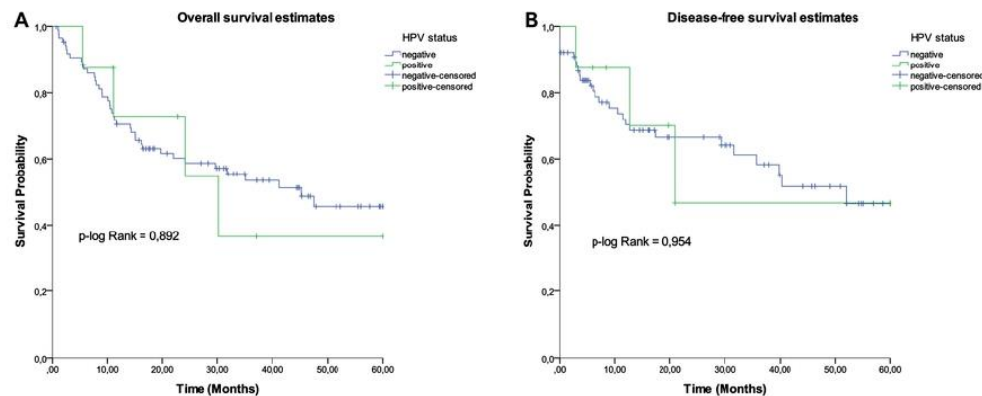


Fig. 2. Kaplan Meier estimates of survival among patients with oral cavity squamous cell carcinoma, according to HPV status. (A) Overall survival. (B) Disease-free survival.

sult supports the evidence that oral cavity is an uncommon anatomical site for HPV-driven cancer.

Funding

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado do Espírito Santo (FAPES) and PPSUS (Edital FAPES/CNPq/Decit-SCTIE-MS/SESA Nº 03/2018) – Finance Code 83139940/2018. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

CRediT authorship contribution statement

Priscila Marinho de Abreu: Conceptualization, Methodology, Investigation, Writing - original draft, Visualization. **Isabella Bittencourt do Valle:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Thabata Coeli Dias Damasceno:** Validation, Data curation, Writing - review & editing. **Anna Clara Gregório C6:** Validation, Data curation, Writing - review & editing. **Paola Fernandes Pansini:** Formal analysis, Investigation, Writing - review & editing. **José Roberto Vasconcelos de Podestá:** Resources, Writing - review & editing. **Evandro Duccini de Souza:** Resources, Writing - review & editing. **Ricardo Mai Rocha:** Resources, Writing - review & editing. **Maria Paula Curado:** Formal analysis, Investigation, Writing - review & editing. **Hisham Mehanna:** Resources, Writing - review & editing. **Sandra Ventorin von Zeidler:** Conceptualization, Methodology, Supervision, Project administration, Writing - review & editing.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Acknowledgements

We acknowledge to head and neck division of Hospital Santa Rita de Cássia – AFECC, University Hospitals Coventry & Warwickshire and Laboratório Multiusuários de Histoquímica – UFES for technical support.

References

Abreu, P.M., C6, A.C.G., Azevedo, P.L., Valle, I.B., Oliveira, K.G., Gouvea, S.A., ... von Zeidler, S.L.V., 2018. Frequency of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 18 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4247-3>.
 Ang, K.K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D.I., Nguyen-Tân, P.F., ... Gillison, M.L., 2010. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England Journal of Medicine* 363 (1), 11.
 Bishop, J.A., Ma, X.-J., Wang, H., Luo, Y., Illei, P.B., Begum, S., ... Westra, W.H., 2012. Detection of transcriptionally active high-risk HPV in patients with head and

neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA in situ hybridization method. *The American Journal of Surgical Pathology* 36 (12), 1874–1882. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318265fb2b>.
 Brierley, J.D., Gospodarowicz, M.K., Wittekind, C., 2017. *TNM: Classification of malignant tumours*, 8th ed. Wiley-Blackwell.
 Chen, X., Zhao, Y., 2017. Human papillomavirus infection in oral potentially malignant disorders and cancer. *Archives of Oral Biology* 83, 334–339. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.08.011>.
 Ferraz, L.D.C., Beatriz, A., Santos, R., Discacciati, M.G., 2012. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. *Journal of the Health Sciences Institute* 30 (2), 107–111.
 Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
 Hauck, F., Oliveira-Silva, M., Dreyer, J.H., Perrusi, V.J.F., Arcuri, R.A., Hassan, R., ... Niedobitek, G., 2015. Prevalence of HPV infection in head and neck carcinomas shows geographical variability: A comparative study from Brazil and Germany. *Virchows Archiv* 466 (6), 685–693. <https://doi.org/10.1007/s00428-015-1761-4>.
 Hubbers, C.U., Akgul, B., 2015. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence* 6 (3), 244–248. <https://doi.org/10.1080/21505594.2014.999570>.
 McCord, C., Xu, J., Xu, W., Qiu, X., McComb, R.J., Perez-Ordóñez, B., ... Bradley, G., 2013. Association of high-risk human papillomavirus infection with oral epithelial dysplasia. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 115 (4), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.01.020>.
 Mehanna, H., Beech, T., Nicholson, T., El-hariry, I., Mcconkey, C., Pileri, V., ... Roberts, S., 2012. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—Systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head & Neck* 1–10. <https://doi.org/10.1002/hed.22015>.
 Mills, A.M., Dirks, D.C., Poulter, M.D., Mills, S.E., Stoler, M.H., 2017. HR-HPV E6/E7 mRNA in situ hybridization. *The American Journal of Surgical Pathology* 41 (5), 607–615. <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000000800>.
 Mirghani, H., Casiraghi, O., Amen, F., He, M., Ma, X.-J., Saulnier, P., ... Vielh, P., 2015. Diagnosis of HPV-driven head and neck cancer with a single test in routine clinical practice. *Modern Pathology* 28 (12), 1518–1527. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.113>.
 Mirghani, H., Casiraghi, O., Guerlain, J., Amen, F., He, M.-X., Ma, X.-J., ... Vielh, P., 2016. Diagnosis of HPV driven oropharyngeal cancers: Comparing p16 based algorithms with the RNAscope HPV-test. *Oral Oncology* 62, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.10.009>.
 Nauta, I.H., Rietbergen, M.M., van Bokhoven, A.A.J.D., Bloemena, E., Witte, B.I., Heide-man, D.A.M., ... Leemans, C.R., 2018. Evaluation of the 8th TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands, and the importance of additional HPV DNA-testing. *Annals of Oncology* 1–7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy060>, February 2018.
 Oguejofor, K.K., Hall, J.S., Mani, N., Douglas, C., Slevin, N.J., Homer, J., ... West, C.M.L., 2013. The prognostic significance of the biomarker p16 in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical Oncology* 25 (11), 630–638. <https://doi.org/10.1016/j.clon.2013.07.003>.
 Pannone, G., Rodolico, V., Santoro, A., Lo Muzio, L., Franco, R., Botti, G., ... Bufo, P., 2012. 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* 7 (1), 4. <https://doi.org/10.1186/1750-9378-7-4>.
 Schache, A.G., Liloglou, T., Risk, J.M., Jones, T.M., Ma, X.-J., Wang, H., ... Robinson, M., 2013. Validation of a novel diagnostic standard in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *British Journal of Cancer* 108, 1332–1339. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.63>, November 2012.
 Shigeishi, H., Sugiyama, M., 2016. Risk factors for oral human papillomavirus infection in healthy individuals: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Medicine Research* 8 (10), 721–729. <https://doi.org/10.14740/jocmr2545w>.
 Simonato, L.E., Miyahara, G.I., 2007. O Papel do Papilomavírus Humano na Carcinogênese Bucal. *Revista Brasileira de Cancerologia* 53 (17), 471–476.
 Souto, R., 2005. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia* 51 (2), 155–160.

- Syrjänen, S., Lodi, G., von Bültzingslöwen, I., Aliko, A., Arduino, P., Campisi, G., ... Jontell, M., 2011. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: A systematic review. *Oral Diseases* 17 (Suppl. 1), 58–72. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2011.01792.x>.
- Termine, N., Panzarella, V., Falaschini, S., Russo, A., Matranga, D., Lo Muzio, L., ... Campisi, G., 2008. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: A meta-analysis (1988–2007). *Annals of Oncology* 19, 1681–1690. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn372>.
- Tezal, M., 2012. Interaction between chronic inflammation and oral HPV infection in the etiology of head and neck cancers. *International Journal of Otolaryngology* 1–9. <https://doi.org/10.1155/2012/575242>, 2012(Table 1).
- Ukpo, O.C., Flanagan, J.J., Ma, X.-J., Luo, Y., Thorstad, W.L., Lewis, J.S., 2011. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 35 (9), 1343–1350. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318220e59d>.
- Volpi, C.C., Ciniselli, C.M., Gualeni, A.V., Plebani, M., Alfieri, S., Verderio, P., ... Ghoghini, A., 2018. In situ hybridization detection methods for HPV16 E6/E7 mRNA in identifying transcriptionally active HPV infection of oropharyngeal carcinoma: An updating. *Human Pathology* 74, 32–42. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2017.09.011>.
- Wang, F., Flanagan, J., Su, N., Wang, L.C., Bui, S., Nielson, A., ... Luo, Y., 2012. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics* 14 (1), 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2011.08.002>.
- Wang, H., Wang, M.X.-M., Su, N., Wang, L., Wu, X., Bui, S., ... Ma, X.-J., 2014. RNAscope for in situ detection of transcriptionally active human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Visualized Experiments* (85), 3–7. <https://doi.org/10.3791/51426>.

6 CONCLUSÕES

A partir das análises realizadas e resultados obtidos, foi possível concluir que:

Neste estudo, o p16 não se mostrou um bom biomarcador de prognóstico ou progressão. Além disso, a expressão desta proteína não mostrou ser indicativa de infecção por HPV em CE oral, e desta forma não há evidências que justifiquem o uso do p16 como forma indireta de se detectar o HPV na cavidade oral. Porém, foi observada relação entre os pacientes com tumores p16-negativos e HPV-negativos, o que pode indicar que um paciente p16-negativo tem grandes chances de não apresentar infecção por HPV, podendo ser utilizado como uma importante ferramenta para rastreamento, uma vez que tem baixo custo e pode ser facilmente implantado na rotina clínica.

O EGFR mostrou relação significativa entre tamanho do tumor e a sua expressão, o que poderia indicar sua aplicação como biomarcador de progressão. Porém, esta hipótese não foi confirmada ao comparar médias de expressão nos segmentos epitélio adjacente, displasia e tumor, o que leva a acreditar que EGFR não teria aplicação nem como biomarcador de prognóstico e nem como biomarcador de progressão. Porém, a relação entre tumores de maiores dimensões e alta expressão de EGFR confirma que o uso do EGFR como alvo terapêutico é justificável. A expressão de EGFR não mostrou relação com os tumores HPV-negativos da cavidade oral e, portanto, não pode ser utilizado para prever ausência da infecção por HPV neste sítio anatômico.

A hibridização *in situ* utilizando sondas de RNA E6/E7 parece ter maior sensibilidade que a PCR convencional. Os resultados desta pesquisa mostraram existir uma correlação fraca entre a expressão de p16 e a detecção de RNAm E6/E7 HPV por hibridização *in situ*. Isto indica que a utilização isolada da expressão do p16 para prever infecção por HPV pode não ser a melhor opção para a detecção do vírus e, por detectar HPV transcricionalmente ativo, a associação com a hibridização *in situ* utilizando sondas de RNA se torna uma opção mais precisa, já que nem sempre um paciente p16-positivo é um paciente HPV-positivo.

Adicionalmente, a frequência de HPV em CE oral ainda se manteve baixa, mesmo com a maior sensibilidade da técnica de ISH-RNA, o que pode indicar realmente que a cavidade oral é um sítio anatômico incomum para o HPV e que possivelmente essa infecção não seja um fator de risco determinante para o desenvolvimento do carcinoma epidermoide oral.

Ao estratificar os pacientes com CE orofaríngeo em grupos de risco, considerando o status HPV, se observa que os pacientes com infecção por HPV responderam de forma semelhante aos pacientes com baixo consumo de tabaco, sendo todos incluídos no grupo de baixo risco. Porém, a baixa quantidade de pacientes HPV-positivos em CE orofaríngeo limita melhor exploração destes resultados.

A frequência em CE orofaríngeo também não foi tão expressiva quanto às frequências encontradas em vários outros estudos mundialmente, o que pode indicar que para os pacientes deste estudo, o HPV ainda não é fator causal predominante para o desenvolvimento do CE orofaríngeo, como é em outros países. No Brasil, os hábitos tabagista e etilista têm uma forte relação para a origem de CE oral e orofaríngeo.

7 PERSPECTIVAS

Acreditamos que seja necessária a continuidade deste trabalho, com um estudo de sensibilidade e especificidade da hibridização *in situ* utilizando sondas de RNA, tendo como padrão a técnica que é considerada o padrão-ouro para a detecção de HPV, a RT-qPCR. Além disso, priorizar as análises com um grupo de pacientes HPV-positivos maior, para fidelizar os resultados do impacto da infecção na sobrevida dos pacientes e resposta ao tratamento radioquimioterápico.

Assim, poderemos ter respostas quanto à sensibilidade e especificidade da detecção de HPV por ISH-RNA comparada à detecção por RT-qPCR, o que sustentaria a aplicação na rotina clínica associada à imuno-histoquímica do p16. A aplicação associada da detecção do HPV por ISH-RNA com a imunohistoquímica do p16 resolveria o viés derivado da porcentagem de tumores p16-positivos que não são HPV-negativos, gerando resultados mais fidedignos e melhor rastreio pelos serviços de oncologia clínica, radioterapia e cirurgia de cabeça e pescoço.

REFERÊNCIAS

- ABREU, Priscila Marinho et al. Frequency of HPV in oral cavity squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018.
- AMIN, Mahul B. et al. **AJCC Cancer Staging Manual**. Cham: Springer International Publishing, 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-40618-3>>.
- ANANTHARAMAN, Devasena et al. Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. **International Journal of Cancer**, v. 140, n. 9, p. 1968–1975, 1 maio 2017.
- ANG, K. Kian et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. **The new england journal of medicine**, v. 363, n. 1, p. 24–35, 2010.
- BABIKER, Ali Yousif et al. Expressional Analysis of P16 and Cytokeratin19 Protein in the Genesis of Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 7, n. 6, p. 1524–1530, 15 jun. 2014.
- BECK, Tim N et al. EGFR and RB1 as Dual Biomarkers in HPV-Negative Head and Neck Cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 15, n. 10, p. 2486–2497, 2016.
- 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.
- BETTAMPADI, Deepti et al. Oral human papillomavirus prevalence and type distribution by country (Brazil, Mexico and the United States) and age among HPV infection in men study participants. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 11, p. 3026–3033, 2019.
- BRAY, Freddie; FERLAY, Jacques; SOERJOMATARAM, Isabelle. Global Cancer Statistics 2018 : GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. p. 394–424, 2018.
- BRENER, Sylvie 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.
- BRIERLEY, James D.; GOSPODAROWICZ, Mary K.; WITTEKIND, Christian. **TNM: classification of malignant tumours**. 8. ed. [S.l.]: Wiley-Blackwell, 2017.
- BURTNESS, Barbara; BAUMAN, Julie E.; GALLOWAY, Thomas. Novel targets in HPV-negative head and neck cancer: Overcoming resistance to EGFR inhibition. **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 8, p. e302–e309, 2013.
- BYEON, Hyung Kwon; KU, Minhee; YANG, Jaemoon. Beyond EGFR inhibition: multilateral combat strategies to stop the progression of head and neck cancer.

Experimental & Molecular Medicine, v. 51, n. 1, p. 1-14, 16 jan. 2019.

CASTELLSAGUÉ, Xavier et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 108, n. 6, p. 1–12, 2016.

CHAKROBARTY, Bidyut 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. 211–216, maio 2014.

CHATURVEDI, Anil 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..

CHOI, Yoon Seong et al. Human papillomavirus and epidermal growth factor receptor in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma: Correlation with dynamic contrast-enhanced MRI parameters. **American Journal of Roentgenology**, v. 206, n. 2, p. 408–413, 2016.

COLOMBO, Jucimara; RAHAL, Paula. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço Genetic Changes in Head and Neck Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 2, p. 165–174, 2008.

COMBES, Jean-damien; FRANCESCHI, Silvia. Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers. **Oral Oncology**, v. 50, n. 5, p. 370–379, 2014.

COSTA, V. et al. EGFR amplification and expression in oral squamous cell carcinoma in young adults. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 47, n. 7, p. 817-823, fev. 2018.

DA COSTA, Alexandre A B A et al. The Roles of PTEN, CMET, and P16 in Resistance to Cetuximab in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 36, n. 1, p. 1-9, nov. 2018.

EZE, Nnamdi et al. PTEN Loss Is Associated with Resistance to Cetuximab in Patients with Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Oral Oncology**, v. 91, p. 69–78, abr. 2019.

FENG, Bohai et al. Integrative Analysis of Multi-Omics Data Identified EGFR and PTGS2 as Key Nodes in a Gene Regulatory Network Related to Immune Phenotypes in Head and Neck Cancer. **Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research**, mar. 2020.

FERRAZ, Laís De Campos 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.

FREITAS, Claudia Sondermann. Estendendo o Conhecimento sobre a Família Her-

Receptores para o Fator de Crescimento Epidérmico e seus ligantes às Malignidades Hematológicas. **Revista Brasileira De Cancerologia**, v. 54, n. 1, p. 79–86, 2008.

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

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

HAEGGBLOM, Linnea et al. Time to change perspectives on HPV in oropharyngeal cancer. A systematic review of HPV prevalence per oropharyngeal sub-site the last 3 years. **Papillomavirus Research**, v. 4, n. May, p. 1–11, 2017.

HAUCK, Franziska et al. Prevalence of HPV infection in head and neck carcinomas shows geographical variability: A comparative study from Brazil and Germany. **Virchows Archiv**, v. 466, n. 6, p. 685–693, 2015.

HUBER, Michael a.; TANTIWONGKOSI, Bundhit. Oral and Oropharyngeal Cancer. **Medical Clinics of North America**, v. 98, n. 6, p. 1299–1321, 2014.

JORDAN, Richard 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. D

KAMINAGAKURA, Estela 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.

KUMAR, Bhavna et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. **Clinical Oncology**, v. 26, n. 19, p. 3128–3137, 2008.

LAI, Kenneth et al. Differences in survival outcome between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma in relation to HPV status. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 46, n. 8, p. 574–582, 2017.

LEEMANS, C. René; SNIJDERS, Peter J.F.; BRAKENHOFF, Ruud H. The molecular landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 5, p. 269–282, 2018.

LINGEN, Mark 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, Victor et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity rarely harbours oncogenic human papillomavirus. **Oral oncology**, v. 47, n. 8, p. 698–701, ago. 2011.

LÓPEZ, Rossana Verónica Mendoza 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, Fátima et al. Oral cancer , HPV infection and evidence of sexual transmission. **Oral Medicine and Pathology**, v. 18, n. 3, p. 439–444, 2013.

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

MAYNE, Susan T et al. Alcohol and Tobacco Use Prediagnosis and Postdiagnosis, and Survival in a Cohort of Patients with Early Stage Cancers of the Oral Cavity, Pharynx, and Larynx. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology**, v. 18, n. 12, p. 3368–3374, dez. 2009.

MILLS, Anne M. et al. HR-HPV E6/E7 mRNA In Situ Hybridization. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 41, n. 5, p. 607–615, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: [s.n.], 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. [S.l: s.n.], 2020. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>.

MUÑOZ, Juan P et al. Tobacco Exposure Enhances Human Papillomavirus 16 Oncogene Expression via EGFR/PI3K/Akt/c-Jun Signaling Pathway in Cervical Cancer Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 3022, p. 1-12, 17 dez. 2018.

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

NAGANO, Tatsuya; TACHIHARA, Motoko; NISHIMURA, Yoshihiro. Mechanism of Resistance to Epidermal Growth Factor Receptor-Tyrosine Kinase Inhibitors and a Potential Treatment Strategy. **Cells**, v. 7, n. 11, p. 212, 15 nov. 2018.

NAUTA, I H et al. Evaluation of the 8th TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands, and the importance of additional HPV DNA-testing. **Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology**, n. February 2018, p. 1–7, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29438466>>.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK, Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, v. 517, n. 7536, p. 576–582, 28 jan. 2015.

NYATI, MK et al. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 11, p. 876–85, 2006.

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.

PALVE, Vinayak et al. Detection of High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Using Multiple Analytes and Their Role in Patient Survival. **Journal of Global Oncology**, n. 4, p. 1–33, 2018.

PANNONE, Giuseppe 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.

PARSONS, Mike; GRABSCH, Heike. How to make tissue microarrays. **Diagnostic Histopathology**, v. 15, n. 3, p. 142–150, 2009.

PERISANIDIS, Christos et al. Impact of epidermal growth factor receptor, mesenchymal-epithelial transition factor, and insulin-like growth factor receptor 1 expression on survival of patients with oral and oropharyngeal cancer. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 51, n. 3, p. 234–240, 2013.

RIETH, Katherine K.S. et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus in tonsil tissue in healthy adults and colocalization in biofilm of tonsillar crypts. **JAMA Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 144, n. 3, p. 231–237, 2018.

SABA, Nabil F et al. Targeting the EGFR and Immune Pathways in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck (SCCHN): Forging a New Alliance. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 11, p. 1909–1915, 1 nov. 2019..

SAYÁNS, Mario Pérez et al. Comprehensive Genomic Review of TCGA Head and Neck Squamous Cell Carcinomas (HNSCC). **Journal of Clinical Medicine**, p. 1–18, 2019.

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.

SCHACHE, Andrew G et al. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma : sensitivity, specificity and prognostic discrimination. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 19, p. 6262–6271, 2012.

SGARAMELLA, N et al. Expression of p16 in squamous cell carcinoma of the mobile tongue is independent of HPV infection despite presence of the HPV-receptor syndecan-1. **British journal of cancer**, n. March, p. 321–326, 2015.

SHENG, Zhang et al. Detection of high-risk human papillomavirus subtypes in cervical glandular neoplasia by in situ hybridization. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 6, n. 10, p. 2168–2177, 2013.

SIMONATO, Luciana Estevam; MIYAHARA, Glauco Issamu. O Papel do

Papilomavírus Humano na Carcinogênese Bucal. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 17, p. 471–476, 2007.

SKINNER, Heath D et al. Clinical characteristics of patients with multiple potentially human papillomavirus--related malignancies. **Head and Neck**, v. 36, n. 6, p. 819–825, 2014.

SOUTO, Rafael. 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, José Vieira 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.

STURGIS, Erich M. et al. The epidemiology of oral human papillomavirus infection in healthy populations: A systematic review and meta-analysis. **Oral Oncology**, v. 82, n. May, p. 91–99, 2018.

TABERNA, Miren; OLIVA, Marc; MESÍA, Ricard. Cetuximab-Containing Combinations in Locally Advanced and Recurrent or Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. May, 20 maio 2019.

UKPO, Odey C. et al. High-Risk Human Papillomavirus E6/E7 mRNA Detection by a Novel In Situ Hybridization Assay Strongly Correlates With p16 Expression and Patient Outcomes in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 35, n. 9, p. 1343–1350, 2011.

WANG, Fay et al. RNAscope: A novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 14, n. 1, p. 22–29, 2012.

WANG, Hongwei et al. RNAscope for In situ Detection of Transcriptionally Active Human Papillomavirus in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Visualized Experiments**, n. 85, p. 3–7, 2014.

WENDT, Malin et al. Presence of human papillomaviruses and p16 expression in hypopharyngeal cancer. **Head & Neck Oncology**, v. 36, n. 1, p. 107–12, 2013.

WESTRA, William 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 Neck Pathol.** v. 3, n. 1, p. 78–81, 2009.

ZAFEREO, Mark E. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity often overexpresses p16 but is rarely driven by human papillomavirus. **Oral Oncology**, v. 56, p. 47–53, 2016.

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

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO À SAÚDE
Unimed Vitória

Vitória, 27 de junho de 2011.

Projeto No: 318/2011

Parecer: 21/2011 ☐ Inicial ☒ Conclusão

Título: **Estudo de Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil**

Instituição: **Hospital Santa Rita de Cássia**

Pesquisador: **José Roberto V de Podestá**

Grupo e Área Temática Especial: **IA**

Prezado Pesquisador

Após o recebimento e apreciação do projeto e das respostas as pendências formuladas, seguem as observações deste Comitê:

1. Adequar os objetivos de acordo com hipóteses formuladas em linha com a justificativa do projeto.

Parecer do CEP: pendência atendida

2. Incluir, na metodologia os critérios de seleção (inclusão e exclusão) amostral assim como características outras que sejam pertinentes. Explicitar, ainda na metodologia, o estudo piloto, e sua metodologia.

Parecer do CEP: Pendência atendida. O estudo piloto não foi contemplado na metodologia, mas é citado na página 17.

3. Justificar ausência do cálculo amostral

Parecer do CEP: Pendência atendida. É citado na página 10 (metodologia) que a amostra será de conveniência.

4. Adequar o TCLE à CNS 347/05 de Janeiro 2005 e incluir campos para identificação de quem aplicou o TCLE. É direito inalienável do sujeito de pesquisa saber ou não querer saber sobre seus resultados de exames realizados em sua propriedade biológica, tenha ou não aplicabilidade clínica. Pede-se, portanto, para rever a informação sobre o tema no TCLE.

Parecer do CEP: pendência atendida. TCLE devidamente adequado e, sobe nossa avaliação, dentro dos critérios éticos e alinhados com a resolução 196/1996 e suas complementares.





Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

Parecer do CEP: pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

Parecer do CEP: pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

Parecer do CEP: pendência atendida

CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

APROVADO

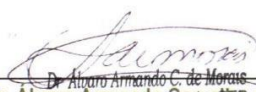
É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,


Dr. Álvaro Armando Garvalho de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em
Seres Humanos do CIAS

ANEXO B - PARECER DO CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE DA COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER Nº. 681/2011

Registro CONEP 16525 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – Não há CAAE ou nº de Folha de Rosto **Processo nº** 25000.098091/2011-05
Projeto de Pesquisa: *"Estudo de Câncer de cabeça e pescoço no Brasil"*. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de 10/04/2011.
Pesquisador Responsável: José Carlos de Oliveira
Instituição: ACCG/Instituto Ensino e Pesquisa/Hospital Araújo Jorge (**1º CENTRO BRASILEIRO**)
CEP de origem: CEP - ACCG - Instituto de Ensino e Pesquisa/GO
Área Temática Especial: Genética humana
Patrocinador: Não informado.

Sumário geral do protocolo

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo de neoplasias que surgem na cavidade oral, faringe e laringe. É o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, representando cerca de 6% dos casos de câncer. Em todo o mundo, mais de 500.000 novos casos e 300.000 óbitos por câncer de cabeça e pescoço são estimados para ocorrer a cada ano. Este meio milhão de casos inclui 262.700 cânceres da cavidade oral, 117.200 cânceres de faringe e 169.600 cânceres da laringe. As taxas de incidência padronizadas são 15,3 e 4,5 por 100.000 homens e mulheres, respectivamente. As taxas de incidência no Brasil são cerca de 22,1/100.000 e 3,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente.

O tratamento primário varia de acordo com a localização anatômica e estágio da doença. Para a maioria dos tipos de câncer diagnosticados em estádios iniciais, a ressecção cirúrgica é a principal modalidade de tratamento. No entanto, para certos sítios anatômicos, como as amígdalas, a base da língua e o assoalho da boca, bem como para todos os cânceres localmente avançados, radioterapia é usada, isolada ou combinada com cirurgia. A quimioterapia pode ser utilizada em associação com a radioterapia. No entanto, no Brasil, a taxa de sobrevida em 5 anos ainda é inferior a 50%.

Publicações recentes sugerem um papel para infecção por HPV na sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (ver abaixo seção sobre HPV). Os Polimorfismos genéticos nos genes de reparo do DNA, os genes do ciclo celular, o metabolismo carcinogênico, e vias de genes do fator de crescimento foram analisados em relação à progressão e sobrevida de pacientes com câncer de vias aerodigestivas superiores (VADS). Polimorfismos nos genes XRCC1, FGFR e CCND1 foram associados com a sobrevida em pacientes com cânceres das VADS em pelo menos 2 estudos. No entanto, Hopkins *et al* criticou que esses estudos eram pequenos (<300 casos), muitas vezes tinham descrições inadequadas da população em estudo, não consideraram as comparações múltiplas de forma apropriada e podiam estar sujeitos a viés de publicação. Assim, não existem no momento estudos de seguimento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, que permitam a avaliação simultânea do papel do fumo, álcool, HPV, genética e tratamento

Cont. Parecer CONEP nº. 681/2011

Situação: **Protocolo aprovado com recomendação.**

OBS: No Brasil, além do centro em tela, está prevista a participação dos seguintes centros: Hospital do Câncer de Barretos/SP (Dr. André Lopes Carvalho/CEP do Hospital Câncer Barretos); Hospital Erasto Gaertner/PR (Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos e Dra. Paola Pedruzzi/CEP do Hospital Erasto Gaertner); Hospital A C Camargo/SP (Dr. Luiz Paulo Kowalski e Dr. Mauro Kasuo Ikeda/CEP do Hospital do Câncer - A C Camargo/SP); Associação de Combate ao Câncer em Goiás/Hospital Araújo Jorge/GO (Dr. José Carlos de Oliveira e Drª. Maria Paula Curado/Comitê de Ética do Hospital Araújo); Departamento de Otorrinolaringologia UFGO Goiânia/GO (Dr. Claudinei Cândido Costa/CEP do HC da UFG); Faculdade de Medicina do ABC/SP (Dra. Jossi Ledo Kanda/CEP NÃO INFORMADO); Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer/RN (Dr. Ricardo José Curioso da Silva e Dr. Luis Eduardo Barbalho de Melo /CEP da Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer); Instituto do Câncer do Ceará/CE (Dr. Eric Fernandes de Souza/CEP NÃO INFORMADO); FCECON - Fundação Centro Controle de Oncologia/AM (Dr. Marco Antonio Cruz Rocha e Dr. Jeferson Moreira de Medeiros/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Heliópolis/SP (Dr. Carlos Neutzling Lehn/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Santa Rita/AFECC - Associação Feminina de Educação e Combate ao Câncer/ES (Dr. Jose Roberto Vasconcelos de Podesta/Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS); Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP (Dr. José Francisco de Sales Chagas e Dr. Maria Beatriz Nogueira Pascoal/CEP da PUC Campinas); Hospital Universitário/UnB (Dr. Luiz Augusto Nascimento e Dr. Juliano de Padua Nakashima/Comitê de ética em Pesquisa - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde); Instituto Nacional do Câncer – INCA/RJ (Dr. Fernando Luiz Dias, Dr. Roberto Araujo Lima e Dra. Isabella Costa Santos/Comitê de Ética e Pesquisa do INCA); Instituto Brasileiro de Controle do Câncer/SP (Dra. Adriana Sonderman, Dr. André Bandiera de Oliveira Santos e Dr. Fabio Roberto Pinto/CEP do BCC - Instituto Brasileiro de Controle do Câncer); Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP/SP (Dr. Lenine Garcia Brandão/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Amaral Carvalho FUNDAÇÃO AMARAL CARVALHO/SP (José Getulio Segalla/Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hospital Amaral Carvalho) e Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/SP (Prof. Dr. Marcos B. Paiva/Comitê de Ética em Pesquisa).

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

NOTA: *Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:*

1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa";

2) descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;

3) vínculos do pesquisador;

4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 25 de outubro de 2011.

ANEXO C - PARECER DO NATIONAL RESEARCH ETHICS SERVICE



National Research Ethics Service

Coventry Research Ethics Committee

2nd floor West Wing
University Hospital
Clifford Bridge Road
Coventry
CV2 2DX

24 February 2010

Telephone: 024 7696 7529
Facsimile: 024 7696 5033

Professor Hisham Mehanna
Institute of Head & Neck Studies & Education
University Hospital
3rd floor opposite Ward 32
Clifford Bridge Road
Coventry CV2 2DX

Dear Professor Mehanna

Study Title: Improving treatment selection using Predictive Classifiers of Treatment Response for Head and Neck Cancers and dysplasia.
REC reference number: 10/H1210/9
Protocol number: Version 1.0

The Research Ethics Committee reviewed the above application at the meeting held on 16 February 2010. Thank you for attending to discuss the study.

Ethical opinion

You advised the Committee you were aiming to develop treatment response classification to help predict response to treatment for two types of patients; first patients who have laryngeal voice box or mouth and throat cancer; second patients with laryngeal and mouth dysplasia. Through using the formula you would be able to predict whether a patient with cancer with these characteristics would be best receiving surgery rather than chemotherapy similarly whether patients with oral dysplasia would better respond to surgery rather than a 'wait and see' approach thus individualising treatment for those patients. By linking a series of chemotherapy and genetic tests on the samples and responses to treatment in relevant cohort of patients you have target diseases or cancers by correlating biomarkers. This was a well known protocol for developing biomarkers and classifications in UK, i.e. biomarker road map.

According to the pilot study out of 100 patients 80 could not now be traced so the Committee wanted to know how you would know how the patients had progressed if you could not contact 80%. You explained that patients had been treated and biopsied in the local hospital then followed up, some died some didn't and you would follow up the local ones. You would ask the local team for patients' tissue and pseudo anonymised outcome data; i.e. link anonymised you had no way of tracking the code.

The local centres were responsible for consenting patients via the operating consent form so the Committee wondered if there was a possibility of tissue from someone who did not consent being included in the study. You stated that where there was agreement they would be included but before September 2006 patients' samples could be used without their express consent provided they were anonymised. Under

This Research Ethics Committee is an advisory committee to West Midlands Strategic Health Authority

The National Research Ethics Service (NRES) represents the NRES Directorate within the National Patient Safety Agency and Research Ethics Committees in England

Statement of compliance

The Committee is constituted in accordance with the Governance Arrangements for Research Ethics Committees (July 2001) and complies fully with the Standard Operating Procedures for Research Ethics Committees in the UK.

After ethical review

Now that you have completed the application process please visit the National Research Ethics Service website > After Review

You are invited to give your view of the service that you have received from the National Research Ethics Service and the application procedure. If you wish to make your views known please use the feedback form available on the website.

The attached document "After ethical review – guidance for researchers" gives detailed guidance on reporting requirements for studies with a favourable opinion, including:

- Notifying substantial amendments
- Adding new sites and investigators
- Progress and safety reports
- Notifying the end of the study

The NRES website also provides guidance on these topics, which is updated in the light of changes in reporting requirements or procedures.

We would also like to inform you that we consult regularly with stakeholders to improve our service. If you would like to join our Reference Group please email referencegroup@nres.npsa.nhs.uk.

10/H1210/9

Please quote this number on all correspondence

With the Committee's best wishes for the success of this project

Yours sincerely



Mr Stephen Keay
Chairman

Email: pauline.pittaway@uhcw.nhs.uk

Enclosures: *List of names and professions of members who were present at the meeting and those who submitted written comments*

"After ethical review – guidance for researchers SL-AR2

Copy to: *Mrs Ceri Jones, R&D, UHC&W NHS Trust*