

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES  
PORTADORES DE CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

**ARACAJU**  
**MAIO/2016**

**JULIANA DA SILVA BARROS CEDRAZ**

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES  
PORTADORES DE CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada como partes dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe.

Orientador: Prof. Dr. Cleverson Luciano Trento  
Co-orientador: Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella

**ARACAJU**

**2016**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

C389d Cedraz, Juliana da Silva Barros  
Detecção do Papilomavírus Humano (HPV) em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço / Juliana da Silva Barros Cedraz ; orientador Cleverson Luciano Trento. – São Cristóvão, 2016.  
81 f. : il.

Dissertação (mestrado em Odontologia) –Universidade Federal de Sergipe, 2016.

O

1. Carcinoma. 2. Cavidade oral. 3. Papilomavírus humano. I. Trento, Cleverson Luciano, orient. II. Título

CDU: 616.31-002.4

## **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

A comissão julgadora dos trabalhos de defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 25 de 05 de 2016, considerou a candidata Juliana da Silva Barros Cedraz aprovada.

1. Prof. Dr. Cleverson Luciano Trento
2. Prof. Dr. Wilton Mitsunari Takeshita
3. Prof. Dr. Márcio Campos Oliveira

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, e em especial aos meus pais Carmem e Claudionor, por acreditarem em meu potencial e darem o incentivo necessário para a concretização desse sonho.

## RESUMO

As neoplasias orais são alterações do tecido, que crescem excessivamente e de modo desordenado, possuindo um prognóstico desfavorável, principalmente quando diagnosticado em estágio avançado, o que ocorre em 60% dos casos; quando descoberta em estágios iniciais, há possibilidades de cura. Um dos fatores que tem sido associado ao desenvolvimento da mesma, é a infecção pelo Papiloma Vírus Humano - HPV. Essa é uma relação que ainda está sendo investigada, devido a controvérsia existente nos trabalhos atuais. Assim, o presente trabalho avaliou a prevalência do HPV em indivíduos portadores de câncer de cabeça e pescoço, a fim de se estabelecer uma relação entre as duas condições. Foram avaliadas amostras de citologia esfoliativa de 44 pacientes com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço, atendidos em centros de referência nos estados de Sergipe e Bahia. As amostras foram processadas por Reação em Cadeia da Polimerase para identificação do gene da  $\beta$ -globina e, posteriormente, da presença do vírus HPV. Em seguida, foi realizado o sequenciamento de forma bidirecional. As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas entre si e também com as sequências homólogas disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando-se o programa BLAST. Os dados encontrados foram tabulados nos softwares Med Calc 11 e Minitab 14.0, e submetidos ao teste Qui Quadrado e o *Odds Ratio*. Dos 44 pacientes analisados, 28 (63,6%) foram HPV positivos. Houve uma prevalência do sexo feminino (60,7%), do lar (25%), feodermas (53,6%), entre a quarta e a quinta décadas de vida (21,4%). O sítio de maior acometimento da lesão neoplásica foi a região de língua, com 28,6%. O genoma do HPV foi detectado em nove amostras com apenas um genótipo envolvido, são eles: HPV 16 (33,3%), HPV 18 (22,2%), HPV 35 (22,2%), HPV 11 (11,1%) e HPV 90 (11,1%). O *Odds Ratio* demonstrou que há maior chances para infecção viral em mulheres, etilistas e tabagistas; e através do Teste Qui Quadrado, obteve-se um valor de  $p=0,07$ , não havendo diferenças estatísticas entre os grupos de HPV positivo e negativo. Dessa forma pode-se inferir que embora, em valores absolutos, houve predomínio de indivíduos com a infecção pelo vírus HPV, não houve significância estatística; sendo assim pode-se sugerir que a presença do vírus leve a progressão de lesões malignas, mas ainda é necessário mais estudos para uma associação mais conclusiva.

Palavras-chave: **carcinoma, cavidade oral, papilomavírus humano.**

## ABSTRACT

Oral neoplasias are tissue alterations that grow excessively and disorderly, bearing an unfavorable prognosis mainly when diagnosed in an advanced stage, what happens in 60% of the cases. When discovered in initial stages, there is the possibility of cure. One of the factors that have been associated to the development of the disease is the infection through the human papillomavirus - HPV. This relation still under investigation due to the controversy existing in the current works. Thus, our work assesses the prevalence of HPV among individuals bearing head and neck cancer, in order to establish a relation between both conditions. Exfoliative cytology samples were assessed, from 44 patients diagnosed with head and neck cancer assisted in the reference centers of Sergipe and Bahia. The samples were processed through polymerase chain reaction for the identification of the  $\beta$ -globin gene and, afterwards, of the presence of the HPV virus. Following, the sequencing was performed in a bi-directional way. The nucleotidic sequences obtained were compared with each other and also with the homologous sequences available in the GenBank database, using the BLAST software. The data found were tabulated on the software Med Calc 11 and Minitab 14.0, and underwent the chi-square test and odds ratio. Out of the 44 patients analyzed, 28 (63.6%) were positive for HPV. There was prevalence of the female sex (60.7%), housewives (25%), feoderma (53.6%), between the fourth and fifth decade of life (21.4%). The anatomical region most affected for the injury was the tongue area, with 28.6%. The HPV genome was detected in nine samples with only one genotype involved. Among them are: HPV 16 (33.3%), HPV 18 (22.2%), HPV 35 (22.2%), HPV 11 (11.1%) and HPV 90 (11.1%). The odds ratio showed that there are more chances for viral infection among women, smokers and that ingested alcohol. Through the Chi-square test, there was the value of  $p=0.07$  and no statistical difference was found among the positive and negative for HPV. This way, it could be inferred that although, in absolute value, individuals with the infection through the HPV virus prevailed, there was no significant statistical difference; Thus, it can be suggested that the presence of the virus leads to the development of malign lesions, but more studies are necessary for a more conclusive association.

Key-words: **carcinoma, oral cavity, human papillomavirus.**

## AGRADECIMENTOS

A felicidade em conquistar o tão sonhado título de mestre chega, nesse momento, como base para vislumbrar toda uma carreira acadêmica que está por vir. Foram vinte e quatro meses de entrega total, aproveitando cada oportunidade e cada janela que se abriu, para sorver e trocar com as pessoas que surgiam a cada instante. Agora é tempo de agradecer...

Deus tem um papel fundamental na minha vida, que é o de me sustentar e me guiar na caminhada, removendo todos os medos e fortalecendo a fé de que nada é impossível quando se tem persistência e confiança em si.

Sou grata aos meus pais, os responsáveis pela formação desse perfil perseverante. Fico feliz em saber que me apoiam em todos os planos, independente das possíveis consequências, sempre confiando em meu potencial.

Aos meus irmãos, cunhados, sobrinhos e amigos pelo incentivo, que desde a identificação do nome na lista de aprovados, impulsionaram cada passo e cada nova descoberta.

Ao meu orientador Cleverson Trento, pela confiança e por me dar a liberdade necessária para que eu desenvolvesse e amadurecesse ainda mais esse projeto. Sou grata também por ter possibilitado a aproximação com a graduação, por meio do estágio docente na disciplina Diagnóstico Oral. Estendo esse agradecimento à Cátia e Thais, auxiliares do ambulatório que, com todo esmero, me deram o suporte necessário durante os atendimentos clínicos.

Ao meu coorientador Silvio Dolabella, por ter aberto às portas do Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical – LEPAT, disponibilizando seu tempo, com toda paciência e atenção, para que a etapa laboratorial fosse desenvolvida.

A Sona Jain, mestre que admiro enquanto pessoa e profissional. Caminhou comigo desde os momentos iniciais do trabalho, dividindo um pouco do seu conhecimento. Sempre com todo carinho e uma palavra de apoio, não deixou que o desânimo tomasse conta, quando surgiam os obstáculos.

Ao professor Wilton, o qual sempre me impulsionou e se mostrou solícito, desde as bancas de qualificação para avaliação do projeto, e andamento do trabalho.

À Mariana que pacientemente teve presença constante no desenvolvimento das etapas laboratoriais.

Ao dr José Augusto, profissional sempre disposto a contribuir; e suas auxiliares Andréa e Sílvia, agradeço a disponibilidade, que possibilitou que a coleta das amostras fosse efetivada em dois dos campos de estudo, Serviço de Odontologia do Centro de Oncologia Dr Osvaldo Leite, do Hospital de Urgência de Sergipe- HUSE, e do Serviço de Odontologia Hospitalar Dr João Garcez, do Hospital Cirurgia de Aracaju.

Ao sempre presente Márcio Campos, por ter novamente aberto as portas do Centro de Referência de Lesões Bucais, da Universidade Estadual de Feira de Santana, na Bahia; e pelo constante apoio, desde a graduação, por se fazer referência em minha vida pessoal e profissional.

Agradeço a equipe do Laboratório de Pesquisa de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, na figura da professora Márcia, coordenadora do laboratório, permitiu que fossem realizados os procedimentos necessários para a finalização da pesquisa. À pós-doc Camila Marconi, que me acolheu durante o período em que realizei as atividades em Botucatu, juntamente com Gabriel Vítor Silva, o qual me deu todo suporte no desenvolvimento das mesmas.

Não posso deixar de lembrar da FAPITEC responsável pelo financiamento da bolsa, durante esses dois anos de mestrado.

Enfim, a todos que vibraram desde quando essa conquista não passava de um sonho bom, aguardando o momento certo para se concretizar. E àqueles que, mesmo de longe, choraram comigo e torceram por cada evolução dessa caminhada. Agora são novos planos, focando sempre no aperfeiçoamento e no que me faz feliz. Que o Pai Celestial me direcione nessa caminhada, me possibilitando novas conquistas!

“...ninguém educa ninguém, como tampouco ninguém educa a si mesmo, os homens se educam em  
comunhão mediatizados pelo mundo.” (Paulo Freire)

## SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	11
Lista de Tabelas e Figuras.....	13
1. Introdução.....	14
1.1. Papilomavírus Humano e sua Fisiopatologia.....	14
1.2. Epidemiologia e Etiologia do Câncer Oral .....	16
1.3. Correlação entre o Câncer Oral e o Papilomavírus Humano.....	18
1.4. Técnicas laboratoriais de detecção do vírus nas células.....	20
1.5. Prognóstico da neoplasia decorrente do HPV.....	21
2. Objetivos.....	23
2.1. Objetivo Geral.....	23
2.2. Objetivos Específicos.....	23
3. Metodologia.....	24
3.1. Aspectos Éticos.....	24
3.2. Delineamento do Estudo.....	24
3.3. Coleta .....	25
3.4. Extração do DNA e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	26
3.5. Sequenciamento.....	28
3.6. Análise das sequências.....	29
3.7. Análise dos dados.....	30
4. Resultados.....	30
4.1 Artigo.....	30
5. Considerações Finais.....	53
6. Comunicado à Imprensa.....	53
Referências.....	55
Apêndices.....	62
Apêndice 1. Pareces Consubstanciados do Comitê de Ética.....	62

Apêndice 2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os Pesquisadores Convidados.....	64
Apêndice 3. Termo De Aceite.....	67
Apêndice 4. Termo De Compromisso.....	68
Apêndice 5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para o público participante da amostra do estudo.....	69
Apêndice 6. Ficha de coleta de dados secundários.....	71
Apêndice 7. Protocolo Do Tet - Tris, Edta, Tween 20 (Tampão Para Digestão).....	72
Anexo.....	73
Normas Da Revista Anticancer Research.....	73

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

HPV – Papilomavírus humano

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

LCR – Região Longa de Controle

EDTA – Tris-Ácido Bórico

TBE – Tris Boro EDTA

TET – Tris, EDTA, Tween 20

PRb – Proteína do Retinoblastoma

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetracético

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

ddNTP – Didesoxirribonucleotídeos Fosfatos

pB – Pares de bases

nm – Nanômetros

INCA – Instituto Nacional do Câncer

OMS – organização Mundial da Saúde

UEFS – Universidade Estadual de Feira de Santana

UFS – Universidade Federal de Sergipe

HU - UFS – Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe

LEPAT – Laboratório de Entomologia e parasitologia Tropical

HUSE – Hospital de Urgência de Sergipe

CRLB – Centro de Referência de Lesões Bucais

UNESP – Universidade Estadual de São Paulo

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

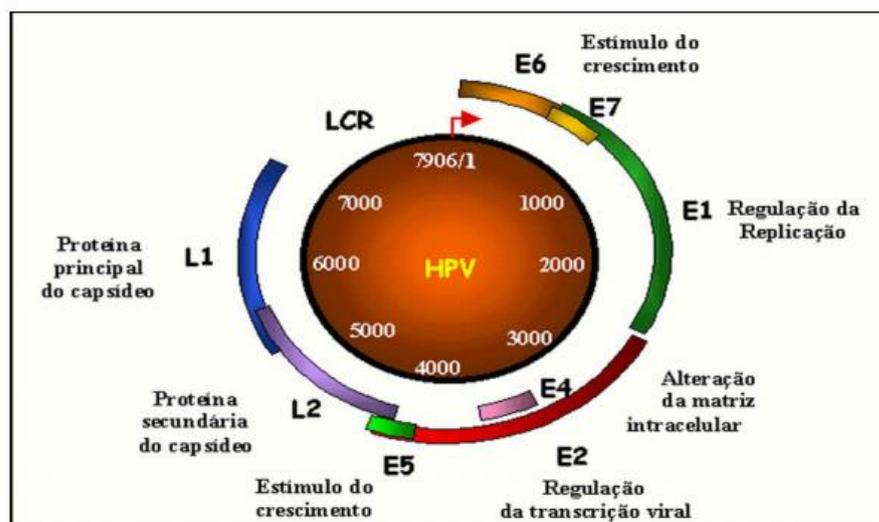
<b>Tabela I</b> – Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- aplicando o teste de qui-quadrado ao nível de significância de 5%.....	37
<b>Tabela II</b> – Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- nas diferentes localizações do carcinoma.....	37
<b>Tabela III</b> – Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- aplicando o <i>Odds Ratio</i> ao nível de significância de 5%, para os diferentes gêneros e hábitos.....	38
<b>Tabela IV</b> – Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- nas diferentes ocupações.....	39
<b>Tabela V</b> – Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- aplicando o teste de qui-quadrado ao nível de significância de 5% nas diferentes raças.....	40
<b>Tabela VI</b> – Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- nas diferentes faixas etárias.....	40
<b>Figura 1</b> – Mapa genômico do HPV (Vaz 1997) .....	14
<b>Figura 2</b> – Gel de agarose a 2% mostrando bandas positivas para $\beta$ -globina, usando os primers RS42/KM29; PM-Peso molecular; + Controle Positivo; - Controle Negativo.....	35
<b>Figura 3</b> - Gel de agarose a 2% mostrando bandas positivas para HPV, após reação de <i>nested</i> PCR, usando os primers MY09/11, GP05/06; PM-Peso molecular; + Controle Positivo; - Controle Negativo.....	36

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO E SUA FISIOPATOLOGIA

Inicialmente descoberto por Strauss em 1949, o Papilomavírus humano (HPV) é um vírus de DNA, dupla fita de 7,9Kb, icosaédrico, não envelopado, da família do Papillomaviridae (QUINTERO et al., 2013). Possui 55nm, 8000 pares de bases, com uma única cadeia codificadora que compreende três regiões: região regulatória – Longa de Controle (LCR), não codificante, que contém a origem de transcrição e replicação do DNA viral; região precoce (E), que codifica proteínas não estruturais envolvidas na replicação do genoma viral (genes E1 e E2), regulação da transcrição (gene E2), a maturação das partículas virais (gene E4), a amplificação do genoma viral, células de diferenciação, transformação e imortalização celular (genes E6 e E7); e região tardia (L), que codifica proteínas do capsídeo por meio dos genes L1 e L2 (Figura 1) (ST GUILY et al., 2011; VIETÍA et al., 2014).

Figura 1: Mapa genômico do HPV (Vaz 1997)



Há mais de 150 tipos virais catalogados, contudo o modo em que se associa a célula hospedeira é quem vai determinar seu potencial oncogênico. Variam conforme seu tropismo e genótipos e se dividem conforme a capacidade de expressão das proteínas E6 e E7, ou seu potencial oncogênico, em risco desconhecido; baixo risco, mais comumente os tipos 6 e 11, os responsáveis pelo desenvolvimento de lesões benignas, como os condilomas (ALBRING et al., 2006; MACHADO et al., 2010; ST GUILY et al., 2011). Os tipos virais de alto risco, 16 e 18 principalmente, são os relacionados às lesões pré-neoplásicas e neoplásicas (ST GUILY et al., 2011).

Quando instalado, o HPV promove modificações no epitélio infectado (QUINTERO et al., 2013). De acordo com a especificidade, este vírus pode ser cutaneotrófico (afetam áreas não genitais) ou mucosogenitotrófico (infectam mucosas da genitália, oral, ocular e respiratória) (QUINTERO et al., 2013).

A infecção se inicia em células basais que foram expostas a microtraumas, lesões ou abrasões na epiderme. A persistência da mesma é caracterizada pela presença de DNA viral na forma episomal (ainda não integrado na célula hospedeira). Quando a infecção torna-se produtiva, o DNA viral, que antes era circular, passa a ser linear se incorporando ao DNA da célula hospedeira (ALBRING et al., 2006; GUILY et al., 2011). A partir daí, inicia a produção das oncoproteínas, E6 e E7. Estas inativam os genes p53 e pRb, respectivamente, interferindo no ciclo celular. A p53, “guardiã do genoma”, deixa de promover apoptose (morte celular programada) e a pRb possui sua função de supressão tumoral inativada. A anulação dessas funções resulta na instabilidade genômica, induzindo a malignização das células (ALBRING et al., 2006; ANTONSSON et al., 2015; ARBABI-KALATI et al., 2014; ST GUILY et al., 2011).

Uma característica morfológica importante é a coilocitose, uma célula escamosa intermediária que apresenta um grande vacúolo citoplasmático ao redor de um núcleo anormal. Outros aspectos são a disqueratose, binucleação e multinucleação (ALBRING et al., 2006).

A progressão da fase de incubação para a de expressão, ou infecção produtiva, depende, dentre outras coisas, da permissividade celular, do tipo de vírus, do estado imunológico do hospedeiro, dos fatores exógenos, e da co-morbidade, ou seja, da presença de uma doença ou condição que não se relaciona diretamente com a enfermidade, mas pode influenciar no desenvolvimento da mesma (DALEY et al., 2014; HUBBARD, 2003; QUINTERO et al., 2013; SALAZAR et al., 2014; SOARES et al., 2007).

Os profissionais cirurgiões-dentistas podem identificar a presença das lesões diretamente relacionadas com a infecção pelo vírus, através da realização de procedimentos odontológicos de rotina, como a inspeção no exame clínico, mesmo que o paciente esteja assintomático (HUBBARD, 2003; PINHEIRO et al., 2011). Há ainda os meios semiotécnicos utilizados para detecção das lesões malignas precursoras, que são: a citologia esfoliativa, a citopunção e a biópsia, que deve ser correta e adequadamente indicada e executada, em tempo hábil, visando melhor prognóstico e tratamento adequado (KARINE et al., 2009).

## **1.2. EPIDEMIOLOGIA E ETIOLOGIA DO CÂNCER ORAL**

Diversas entidades mórbidas podem acometer o complexo buco-maxilo-facial, variando desde lesões benignas, de menor complexidade e extensão, até graves tumores malignos, que podem se traduzir em sérios riscos de morte e mutilações para o indivíduo.

Tem-se as verrugas vulgares, associadas principalmente aos tipos virais 2 e 57, e hiperplasia epitelial focal, associada aos tipos 13 e 32. Estas normalmente se apresentam como únicas ou múltiplas, em forma de couve-flor, exofíticas, sésseis ou pediculadas (HUBBARD, 2003). Os tipos de alto potencial de malignidade 16 e 18; e os tipos 2 e 5, que quando associados, já foram identificados em carcinoma epidermóide e em carcinoma verrucoso, normalmente não possuem manifestação clínica inicial (ALBRING et al., 2006; ARBABI-KALATI et al., 2014; ST GUILY et al., 2011).

O câncer oral é uma neoplasia crônica, potencialmente letal, sendo um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, tendo uma incidência global elevada. Não existe um sistema de registro de casos de câncer oral que cubra todo território brasileiro, por isso as estimativas anuais de incidência tornam-se um instrumento de suma importância para se estabelecer os índices de prevalência da doença (MADANI et al., 2010).

Segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer – INCA, a estimativa para 2016 seria de 15490 novos casos da doença, 11140 em homens e 4.350 em mulheres. Deste modo, o câncer de boca ocupa o 5º lugar dentre as neoplasias malignas no Nordeste e o 7º lugar no estado de Sergipe. Vale destacar que em 2011 foram registrados 71 casos de câncer de boca neste estado, sendo 26 casos em Aracaju.

O carcinoma de células escamosas responde por 90% das neoplasias orais (ARBABI-KALATI et al., 2014; BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). Clinicamente se apresenta na região de língua, como uma lesão eritro-leucoplásica, assintomática. Os casos mais avançados evidenciam úlceras, nódulos irregulares com bordas endurecidas. Normalmente possui taxa de sobrevida de cinco anos (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). Possui como perfil do

indivíduo portador, leucodermas, do sexo masculino, pertencente à sexta década de vida (GONZÁLEZ; LÓPEZ, [s.d.]).

Sabe-se que a citada doença, quando descoberta no início, pode ser atenuada ou mesmo curada, principalmente quando seus fatores de risco são controlados (MADANI et al., 2010; SANTOS et al., 2010; SOARES et al., 2002). A mesma possui como etiologia, fatores intrínsecos (genética, imunossupressão e deficiência nutricional) e fatores extrínsecos ao indivíduo. Estes últimos correspondem ao consumo de álcool e tabaco (especialmente o mascavo) (AGARWAL et al., 2011), a dieta, a exposição excessiva ao sol na ausência de proteção, e a infecção por alguns tipos virais, como o Papilomavírus Humano. Ambos são determinantes pela alteração de genes que codificam proteínas envolvidas no reparo do DNA ou comprometidas com o controle da proliferação e da diferenciação celulares. É possível, então, supor que esses fatores atuem induzindo mutações gênicas e aberrações cromossômicas que comprometam o funcionamento de alguns desses genes (ACAY et al., 2008; ANTONSSON et al., 2015; ARBABI-KALATI et al., 2014; LEE et al., 2012; PATEL et al., 2013).

### **1.3. CORRELAÇÃO ENTRE O CÂNCER ORAL E O PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

Embora o portador do Papiloma Vírus Humano (HPV) tenha um perfil de adultos jovens, do sexo masculino, caucasianos, não tabagistas e sexualmente ativos (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; ST GUILY et al., 2011; TURNER et al., 2011), as infecções pelo vírus ocorrem em todo o mundo, acometendo ambos os sexos, sendo relativamente comuns. Tal infecção varia de 20 a 40% conforme a idade e o estado imune (CHEN et al., 2012;

HUBBARD, 2003). Estima-se que 50% dos indivíduos se infectam com HPVs de alto risco (ARBABI-KALATI et al., 2014).

Em crianças se discute que esta infecção pode ocorrer por transmissão vertical ou mesmo horizontal, como infecção genital, sugerindo transmissão pré-natal e/ou placentária, por infecção dos fluidos amnióticos. A mesma pode permanecer subclínica ou latente, e reativar quando expostas a fatores. Normalmente são lesões de baixo potencial, contudo há casos em que a papilomatose se associa ao HPV16 e a lesão poderá se converter em displasias, e posteriormente neoplasias como o carcinoma *in situ* ou carcinoma de células escamosas (ST GUILY et al., 2011).

Sabe-se que já é bem estabelecida a relação causal desse vírus no desenvolvimento do câncer cervical em mulheres. Nestas a infecção ocorre na junção entre o epitélio escamoso da esclerótica e epitélio glandular da região endocervical (ST GUILY et al., 2011). Além desta, já se conhece a infecção nas regiões de ânus, pênis e vulva (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; ANTONSSON et al., 2015; ARBABI-KALATI et al., 2014), sendo o contato sexual o principal meio de transmissão (FILHO; NASCIMENTO; XAVIER, 2009). Essas alterações são mais comuns e transitórias, diferindo por vezes na distribuição dos genótipos (ST GUILY et al., 2011).

Tais manifestações podem ser clínicas, quando possuem lesões visíveis ao exame clínico; subclínicas, quando não há sintomatologia, porém há alterações detectadas por métodos diagnósticos (peniscopía, colpocitologia, colposcopia e biópsia); e latentes, quando o diagnóstico só é concluído por meio de técnicas de biologia molecular (XAVIER et al., 2007).

Em se tratando de células escamosas orais, a infecção oral pode ocorrer em qualquer idade, embora existem muitas controvérsias na literatura. Observa-se que não está comprovado que a presença de HPV genital seria predisponente para a infecção bucal

(FILHO; NASCIMENTO; XAVIER, 2009). Quando o HPV é incorporado como um possível responsável pelo desenvolvimento de neoplasias orais, geralmente são os tipos 16 e 18, e as mesmas são localizadas preferencialmente na orofaringe, no nível das criptas tonsilares. Nestas, o epitélio não é uniforme, há porções de epitélio escamoso, interrompendo assim a continuidade da camada basal. Constatou-se que cerca de 25% dos casos de câncer de orofaringe e 50% dos casos de câncer de amígdala têm como agentes o vírus HPV, apresentando assim história natural e patogênese diferentes do habitual, melhorando as perspectivas para o prognóstico da neoplasia (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; ANTONSSON et al., 2015; SMITH et al., 2010; ST GUILY et al., 2011).

#### **1.4. TÉCNICAS LABORATORIAIS DE DETECÇÃO DO VÍRUS NAS CÉLULAS**

Dentre as mais conhecidas técnicas de diagnóstico laboratorial do vírus, tem-se *Southern Blotting*, Hibridização in situ, Imuno-histoquímica, os quais se mostram como métodos eficientes para identificação do mesmo; contudo, existem outros testes, como a Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), que é a mais utilizada e possui baixos valores preditivos negativos (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010). Este método quantifica moléculas de DNA em um processo termocíclico que inclui três etapas: a desnaturação, onde a fita dupla de DNA é separada em fitas simples; anelamento, onde os iniciadores anelam especificamente com as suas sequências complementares de DNA-alvos, e a extensão do iniciador, onde uma DNA polimerase termoestável gera novas fitas de DNA (HUBBARD, 2003; MACHADO et al., 2010).

Para a amplificação de segmentos-alvo são necessários iniciadores, denominados primers, que podem ser: específicos, detectam um tipo simples de HPV; ou os iniciadores

consensus, gerais ou genéricos, que detectam diferentes tipos de HPV em uma única reação (HUDELIST et al 2004). O MY09/MY11 e GP5+/GP6+ são os iniciadores gerais mais comumente utilizados. Os mesmos amplificam sequências-alvo do segmento L1 do genoma do vírus, sendo assim capazes de identificar a presença e o tipo viral instalado. A reação nested é o que torna a técnica mais sensível; os produtos da primeira reação são reamplificados com outro par de primers (ANTONSSON et al., 2015; MENDOZA et al., 2013; TUCCI; HENRIQUE; CASTRO, 2009).

Normalmente os produtos dessa última reação de PCR são submetidos à eletroforese em gel de agarose à 2%, e posteriormente corados. O tamanho dos produtos amplificados é comparado com o padrão de pares de bases e visualizados sob transiluminação ultra-violeta.

Para genotipagem o teste mais comumente utilizado é o *Linear Array*, que detecta 37 tipos virais, amplificando o DNA e realizando hibridização com posterior detecção colorimétrica das ligações.(PINTOS et al., 2008)

## **1.5. PROGNÓSTICO DA NEOPLASIA DECORRENTE DO HPV**

Apesar da necessidade de se saber a taxa de estadiamento para se planejar o tratamento e estabelecer o prognóstico, observa-se que os portadores de cânceres decorrentes da infecção por HPV, a depender do estágio do tumor, possuem maior sobrevida em relação aos demais fatores de risco. Após instituído o tratamento, observa-se uma melhor resposta por parte do paciente, uma vez que tem se constatado que as neoplasias, decorrentes da infecção por HPV, são mais radio e quimiossensíveis (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; BIRON; O'CONNELL; SEIKALY, 2013; ST GUILY et al., 2011).

O progresso da terapêutica vai depender da história atual e não apenas da adição de tratamentos mais agressivos. Com essa abordagem, observa-se uma mudança de paradigmas no enfoque clínico atual para diagnóstico, prevenção e tratamento da doença maligna. Menos tratamentos intensivos produzirá redução da toxicidade aguda e tardia, melhorando a qualidade de vida do paciente. Contudo, essa abordagem não se estende para as neoplasias de diferentes etiologias.(ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; ANTONSSON et al., 2015).

Vale ressaltar que quando há histórico de consumo de tabaco o prognóstico se agrava, uma vez que há alteração da biologia local (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; SMITH et al., 2010; ST GUILY et al., 2011). O fumo, diferentemente da infecção pelo HPV, danifica o sistema imune a medida que reduz a ação dos linfócitos CD4<sup>+</sup> e das células de Langerhans (ARBABI-KALATI et al., 2014). Este fato também pode aumentar a probabilidade de contaminação por vírus, como por exemplo, o Papilomavírus Humano, uma vez que diminui a imunidade do hospedeiro, tornando-o suscetível às infecções (ARBABI-KALATI et al., 2014; LINGEN et al., 2013).

Assim, necessita-se conhecer o perfil do paciente portador e os fatores que o levam ao desenvolvimento da doença. Este fato possibilitará a criação de ações que possam promover a prevenção e adequado tratamento, visando a melhora da qualidade de vida do portador (MENDOZA et al., 2013). Embora haja um debate acerca da correlação entre a presença do vírus HPV e o desenvolvimento do câncer de boca, ainda há muitas controvérsias na literatura (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; SMITH et al., 2010; ST GUILY et al., 2011). Dessa forma, o presente trabalho visa aprofundar os estudos a fim de promover um maior embasamento científico a partir do momento que se buscará verificar a prevalência do Papiloma Vírus Humano em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL:**

Analisar a presença e o tipo mais frequente de Papilomavírus Humano (HPV) em amostras bucais de pacientes portadores de carcinoma de cabeça e pescoço, a fim de se estabelecer uma relação causal entre o vírus e a neoplasia.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Avaliar a presença do HPV em amostras bucais de pacientes portadores de carcinoma de cabeça e pescoço através da técnica de PCR;
- Realizar a genotipagem do HPV nas amostras para a PCR para definição dos tipos virais;
- Traçar o perfil epidemiológico dos indivíduos portadores de câncer de cabeça e pescoço acometidos pelo vírus HPV;
- Levantar as principais características sócio-demográficas dos indivíduos portadores de câncer de cabeça e pescoço acometidos pelo vírus HPV;

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1. ASPECTOS ÉTICOS**

O presente trabalho foi realizado consoante a Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde, a qual se refere a pesquisa com seres humanos. Sendo assim, foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Sergipe – UFS e da Universidade Estadual de Feira de Santana na Bahia - UEFES, respectivamente sob os pareceres de nº 903.774 e 982.916, CAAE 36923114.6.0000.5546 (Apêndice 1).

#### **3.2. DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Foi realizado um estudo observacional, transversal, retrospectivo, no período de novembro de 2014 a janeiro de 2016 com uma população de 44 indivíduos com diagnóstico definitivo de carcinoma oral, atendidos em centros de referência para tratamento de lesões bucais dos estados de Sergipe e Bahia, a saber: 1. Ambulatório de Diagnóstico Bucal do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS); 2. Serviço de Odontologia do Centro de Oncologia Dr. Osvaldo Leite, do Hospital de Urgência de Sergipe (HUSE), em Aracaju; 3. Serviço de Odontologia Hospitalar Dr. João Garcez, do Hospital Cirurgia de Aracaju; e 4. Centro de Referência de Lesões Bucais da Universidade Estadual de Feira de Santana (CRLB), na Bahia.

Os coordenadores dos campos de estudo receberam um termo de consentimento livre e esclarecido para participação como pesquisadores voluntários do projeto (Apêndice 2) e assinaram um termo de aceite autorizando a utilização das dependências odontológicas dos

serviços, para serem utilizados ao longo do trabalho (Apêndice 3). Todos os responsáveis pelo estudo receberam e assinaram, em duas vias, um termo de compromisso, no qual se mostravam cientes da importância do cumprimento da Resolução CNS 466/12, referente a pesquisas envolvendo seres humanos, resguardando assim a segurança e bem-estar dos sujeitos recrutados para a pesquisa (Apêndice 4). Além destes, todos os participantes ou responsáveis incluídos na pesquisa, enquanto amostra do estudo, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, concordando com sua participação na pesquisa (Apêndice 5). Os mesmos permanecerão sob anonimato e suas informações serão mantidas em sigilo.

Dados socioeconômicos foram coletados do prontuário dos pacientes, por meio de fichas de coletas de dados secundários (Apêndice 6), para se fazer possíveis associações com os achados clínicos.

Foram considerados critérios de inclusão no estudo: pacientes portadores de neoplasias orais malignas, independente de faixa etária, raça, gênero e localização da neoplasia. Estes pacientes deveriam ter assinado o termo de consentimento livre e esclarecido. E como critérios de exclusão: - pacientes atendidos fora do campo de atuação;- pacientes que não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido; - pacientes que possuíam lesões bucais benignas; - as amostras que em laboratório não foram positivas para o gene da  $\beta$ -globina.

### **3.3. COLETA**

Inicialmente foi realizado um cálculo amostral, o qual resultou em 17. Contudo, uma vez que este valor foi inferior ao que foi encontrado na bibliografia consultada, estabeleceu-se um n de acordo com o dimensionamento literário atual. As amostras foram coletadas por

esfoliação da mucosa oral utilizando escovas citológicas estéreis nas regiões adjacentes à área lesionada, como palato, mucosa jugal e/ou língua (ESQUENAZI et al., 2010; RIET; RIVERO; NUNES, 2006; TUCCI; HENRIQUE; CASTRO, 2009). O material citológico coletado foi armazenado em tubos do tipo Falcon<sup>R</sup> de 20 mL contendo TET - Tampão para digestão – Tris, EDTA, Tween 20 (Apêndice 7) e encaminhado ao Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical (LEPAT) da Universidade Federal de Sergipe, onde seu DNA foi extraído, amplificado para detecção do gene da beta-globina e armazenado até realização da PCR para HPV. O material coletado foi armazenado a 4°C até a extração do DNA e, após extração, o DNA purificado foi mantido em freezer a -20°C até a realização da PCR (MELO et al., 2010).

As reações de *nested* PCR e genotipagem do HPV foram realizadas no LEPaT e no Laboratório de Imunopatologia da Relação Materno-Fetal, do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina-UNESP em Botucatu/São Paulo.

### **3.4. Extração do DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

A extração de DNA do material coletado foi realizada utilizando-se o Kit de Extração de DNA da Promega conforme orientações do fabricante.

Como controle de qualidade da extração de DNA das amostras foi utilizado o par de *primers* RS42/KM29 para amplificação do gene da  $\beta$ -globina, constitutivo do DNA humano, gerando uma banda de aproximadamente 550 pares de base. Um controle negativo foi utilizado em todas as reações, no qual o ácido nucléico foi substituído por 2 $\mu$ L de água Milli-Q, e o controle positivo foi constituído de células do DNA humano. As amplificações foram realizadas em termociclador *Veriti® Thermal Cycler (Applied Biosystems)*, seguindo as

condições de reação: 95°C durante 5 minutos para a desnaturação inicial; 94°C por 1 minuto, 60°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C durante 1 minuto para a amplificação, seguido por outros 35 ciclos idênticos ao descrito acima, finalizando com extensão de 10 minutos a 72°C e manutenção das amostras a 4°C. Para todas as análises foram consideradas apenas as amostras que foram positivas para  $\beta$ -globina.

Para a amplificação do genoma do HPV foi utilizada a técnica de *nested* PCR utilizando-se os *primers* gerais MY09/MY11 e GP5+/6+ que amplificam sequências de pares de base da região L1 do DNA do HPV (BLITZER et al., 2014; RIET; RIVERO; NUNES, 2006). Os *primers* MY09/MY11 amplificam uma sequência aproximada de 450pb e o par GP5+/GP6+ amplifica uma sequência de aproximadamente 150pb (Qu et al.; 1997).

Inicialmente 2 $\mu$ L de cada amostra (100ng de DNA total) foram amplificados com os *primers* MY09/11, proporcionalmente 1 $\mu$ L de 10 uM (CHUANG et al., 2012), utilizano-se ainda 10 $\mu$ L de PCR Mix Red (Norgen) . A segunda PCR consistiu na amplificação de 2 $\mu$ L do produto da primeira PCR utilizando-se 1 $\mu$ L de 10 uM dos *primers* GP5+/6+, utilizando-se os mesmos 10 $\mu$ L de PCR Mix Red (Norgen) (DURZY et al., 2011). O controle negativo utilizado em todas as reações, foi 2 $\mu$ L de água ultra-pura – Água Mili-Q, enquanto como controle positivo foi utilizado DNA-HPV extraído de células HeLa, que são células de adenocarcinoma cervical.

A amplificação inicial (MY09/MY11) seguiu os seguintes parâmetros: 95°C durante 5 minutos para a desnaturação inicial; 94°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto para anelamento dos *primers* e 72°C durante 1 minuto para a amplificação, seguido por outros 35 ciclos idênticos ao descrito acima, finalizando com extensão de 10 minutos a 72°C e manutenção das amostras a 4°C. Para a reação do *nested* PCR (GP5+/6+): 95°C durante 5 minutos para a desnaturação, 95° durante 45 segundos, 47,7°C por mais 45 segundos para anelamento dos

*primers* e 72°C durante 1 minuto para a amplificação, seguido por outros 44 ciclos idênticos ao descrito acima, finalizando com extensão de 7 minutos a 72°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (Invitrogen) preparado em tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) 1X e corado com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100pb (GE Healthcare) e visualizados sob transiluminação ultra-violeta e as amostras positivas posteriormente encaminhadas para sequenciamento, a fim de se obter a genotipagem das mesmas.

### **3.5. Sequenciamento**

Os produtos purificados após amplificação foram sequenciados bidirecionalmente utilizando-se o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Os iniciadores utilizados para o sequenciamento foram os mesmos empregados nas amplificações de *nested*, ou seja GP05/GP06. A reação de sequenciamento foi realizada em uma placa de 96 poços, cada um contendo um produto de PCR purificado, o *mix* de reação e apenas um dos iniciadores. O volume final em cada poço da placa foi de 10 µL no qual continha 20–40 ng de DNA amplificado na PCR (2 µL de DNA), 0.5 µL de pré-mix *BigDye*, 1,75 µL de tampão de sequenciamento, 4,75 µL de água ultrapura e 1 µL de iniciador a 5 pmol/µL. Posteriormente, a placa preparada foi ciclada em termociclador Veriti (Applied Biosystems, USA), em 40 ciclos de 15 segundos a 96°C, 15 segundos a 50°C e 4 minutos a 60°C.

Após a ciclagem, os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados a fim de eliminar o excesso de iniciadores, sais, dNTPs e ddNTPs não incorporados.

A cada poço da placa foram adicionados 1,0 µL de EDTA 125 mM e 1,0 µL de acetato de sódio 3 M. Em seguida, 25 µL de etanol absoluto foram adicionados a cada poço da placa de sequenciamento, sendo esta vedada, homogeneizada e incubada por 15 minutos ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 40 minutos a 3700 rpm e 20°C. Nesta etapa ocorreu a precipitação das moléculas de DNA. Após a centrifugação, o etanol foi descartado e os *pellets* lavados com 35 µL de etanol 70% e a placa novamente homogeneizada e centrifugada por 15 minutos a 3700 rpm e 4°C. O etanol foi outra vez descartado por inversão e o excesso retirado por evaporação a 95°C.

Após a precipitação, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida *HiDi* (Applied Biosystems, USA). A placa foi vedada com uma *septa* específica para separação eletroforética em capilar. O sequenciamento foi realizado por separação eletroforética em capilar em um sequenciador modelo *ABI 3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

### **3.6. Análise das sequências**

As sequências nucleotídicas obtidas foram comparadas entre si e também com as sequências homólogas disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando-se o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). A inclusão de cada sequência em um agrupamento ou genótipo foi realizada de acordo com a similaridade apresentada ao se comparar com sequências padrão depositadas no GenBank.

### 3.7. ANÁLISE DOS DADOS

Os resultados obtidos foram sistematizados e tabulados com o auxílio do programa Excel 2010 (Microsoft Corporation., Redmond, WA, USA), além dos softwares Med Calc 11 e Minitab 14.0. Para avaliar a significância estatística de diferenças nas prevalências, foi utilizado o teste Qui-Quadrado de homogeneidade e independência e para avaliar se houve presença e/ou diferença estatisticamente significativa entre as lesões em HPV positivas e HPV negativas, com valor de  $p < 0,05$  (COLON-LÓPEZ et al., 2014; GLOMBITZA; GUNTINAS-LICHIUS; PETERSEN, 2010; SOARES et al., 2007). Utilizou-se também o *Odds Ratio*, a fim de se avaliar as chances da infecção pelo HPV ocorrer diante das características apresentadas pelo indivíduo portador da neoplasia.

## 4. RESULTADOS

**4.1 Artigo:** Este artigo segue as normas da revista Anticancer Research. As normas estão no Anexo 1.

**Título:** Detecção do Papiloma Vírus Humano em pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço.

### **Resumo**

Trata-se de um estudo com 44 casos de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço, atendidos em centros de referência dos estados da Bahia e Sergipe. Após realização de citologia esfoliativa bucal, as amostras foram encaminhadas para análise em laboratório a fim de se avaliar a presença de Papiloma Vírus Humano (HPV) e seu subtipo viral, por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando-se os primers MY09/MY11 e

GP05/GP06, e subsequente sequenciamento. Os resultados foram tabulados no Excel 2010 (Microsoft Corporaion., Redmond, WA, USA); e avaliados pelo Teste Qui Quadrado e o Odds Ratio, quando o n permitia. Os dados foram tabulados nos softwares Med Calc 11 e Minitab 14.0. Vinte e oito pacientes (63,6%) se apresentaram HPV positivos, havendo uma prevalência do sexo feminino (60,7%, 17/28), do lar (25%, 07/28), feodermas (53,6%, 15/28), entre a quarta e a quinta década de vida (21,4%, 09/28), com predomínio da lesão neoplásica em região de língua, (28,6%, 8/28). Em nove amostras foi possível a tipagem, das quais três se apresentaram como HPV 16, duas como HPV 18, duas como HPV 35, uma como HPV 11 e uma como HPV 90.

## **Introdução**

O carcinoma oral de células escamosas é uma doença maligna que se apresenta como um grave problema de saúde pública e com alta morbimortalidade, tendo origem multifatorial, e apresentando como principais responsáveis por seu desenvolvimento o álcool e o tabaco. Contudo, além destes, destaca-se a imunossupressão, a exposição excessiva e sem proteção ao sol e a infecção por alguns tipos de vírus, como o Papiloma Vírus Humano (HPV) (AGARWAL et al., 2011; ARBABI-KALATI et al., 2014; BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010; CHEN et al., 2012; IQBAL et al., 2014; KULKARNI et al., 2011; LINGEN et al., 2013; SMITH et al., 2010; SOARES et al., 2002).

A relação do HPV com a carcinogênese oral tem sido muito relatada na literatura. Este fato foi observado à medida que houve um aumento do número de neoplasias, principalmente na região de orofaringe e laringe, havendo ausência de relatos dos fatores de exposição clássicos, tais como álcool e tabaco (ANTONSSON et al., 2015; ARBABI-KALATI et al.,

2014). Normalmente quando se estabelece essa associação, faz-se inferência aos tipos virais de alto risco, mais comumente HPV 16 e HPV 18, os quais são capazes de alterar o epitélio, aumentando a proliferação celular, o que em determinado momento pode criar um meio propício para o desenvolvimento de uma neoplasia (AGARWAL et al., 2011; ALBRING et al., 2006; ANTONSSON et al., 2015; CHEN et al., 2012; HUBBARD, 2003; IQBAL et al., 2014; KULKARNI et al., 2011; LEITE et al., 2008; LINGEN et al., 2013; QUINTERO et al., 2013; ST GUILY et al., 2011).

Normalmente, os pacientes acometidos pelo HPV oral são adultos jovens, do sexo masculino, de comportamento sexual de risco e com alto número de parceiros ou ainda histórico de sexo oral (ARBABI-KALATI et al., 2014; ARTHUR et al., 2011; LINGEN et al., 2013). Tais pacientes normalmente possuem um prognóstico favorável, quando o diagnóstico se faz precocemente. Fato este observado nas respostas aos tratamentos (ANTONSSON et al., 2015; ARBABI-KALATI et al., 2014).

Contudo, tem se observado que a presença do DNA viral em uma neoplasia não indica que o vírus está biologicamente ativo para desencadear a progressão da lesão, existem diversos outros fatores a serem considerados, tais como a biologia local, perfil e hábitos do indivíduo portador do câncer, dentre outros (RODRIGO et al., 2015).

Assim, sabendo-se que o mecanismo de desenvolvimento da neoplasia decorrente do vírus HPV, na região oral, ainda não está bem esclarecida, esse trabalho visa avaliar a presença do HPV em amostras de citologia esfoliativa bucal, de pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, a fim de se estabelecer uma possível relação entre o vírus e a neoplasia.

## Material e Métodos

O presente trabalho foi realizado consoante a Resolução 466/12, do Conselho Nacional de Saúde, a qual se refere à pesquisa com seres humanos. Sendo assim, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Sergipe – UFS e da Universidade Estadual de Feira de Santana na Bahia - UEFS, respectivamente sob os pareceres de nº 903.774 e 982.916, CAAE 36923114.6.0000.5546.

Trata-se de um estudo observacional, transversal e retrospectivo, no qual foi realizada citologia esfoliativa da mucosa oral de 44 indivíduos com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço, atendidos em centros de referência para diagnóstico e tratamento, nos estados de Sergipe e Bahia.

A fim de verificar a integridade do DNA extraído e a ausência de inibidores de PCR, um segmento de gene de 550bp-globina  $\beta$  humano foi amplificada, utilizando os primers RS42 / KM29. O DNA amplificado foi separado por eletroforese em gel de agarose a 2,0% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), corado com brometo de etídio a 100V e 10 mA, durante 1 hora. Os resultados foram visualizados por transiluminação UV.

A detecção de sequências de HPV foi realizada por PCR com iniciadores internos utilizando dois conjuntos de iniciadores de consenso, MY09 / MY11 e GP5 + / GP6 +, que amplificam um fragmento de 450pb e um fragmento interno de 150bp, respectivamente, do gene L1 de HPV, altamente conservada (9,15). As reações de PCR foram realizadas em termociclador Veriti® (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e continha 10 $\mu$ L pré-mistura de PCR (Red Mastermix), 1,0  $\mu$ L de cada iniciador (10  $\mu$ M), água Milli-Q (Milipore, Billerica, MA, EUA) e 2 $\mu$ L de cada amostra, totalizando um volume final de 20 $\mu$ L.

A reação se deu da seguinte forma: primeiro, o fragmento de 450pb foi amplificado usando as seguintes condições de PCR: desnaturação inicial durante 5 minutos a 95°C; seguido por 36 ciclos de 1 minuto a 94 ° C, 1 minuto a 50°C e 1 minuto a 72°C; e extensão final a 72 ° C durante 10 minutos. A segunda amplificação foi realizada com 2 µL das condições amplicon de PCR como se segue: desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C; 45 segundos a 95 ° C, 45 segundos a 47.7°C e 1 minuto a 72°C durante 44 ciclos; e uma extensão final de 7 minutos a 72 ° C. Os controles negativos (água estéril), controles positivos (HPV-16 extraídos a partir de células HeLa) foram usadas em todas as reações.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% (Invitrogen), preparado em tampão Tris-Ácido Bórico-EDTA (TBE) 1 X e corado com Brometo de Etídio. O tamanho dos produtos amplificados foi comparado com o padrão de 100pb (GE Healthcare), e visualizados sob transiluminação ultra-violeta.

Posteriormente, realizou-se o sequenciamento com o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA), e os *primers* GP5+/6+. As sequências nucleotídicas foram comparadas entre si e com as sequências homólogas presentes no banco de dados GenBank, utilizando-se o programa BLAST.

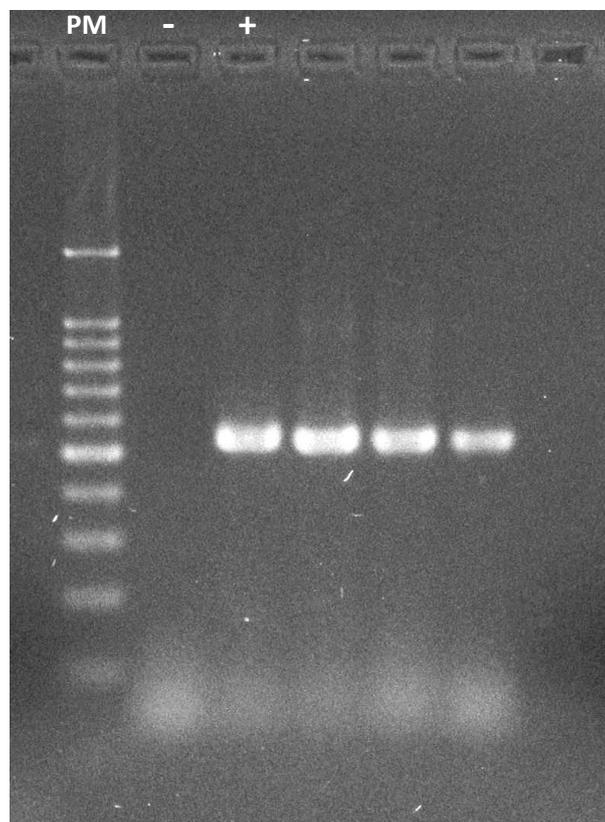
Os resultados obtidos foram sistematizados e tabulados com o auxílio do programa Excel 2010 (Microsoft Corporation., Redmond, WA, USA), além dos softwares Med Calc 11 e Minitab 14.0. Para avaliar a significância estatística de diferenças nas prevalências e para avaliar se houve diferença estatisticamente significativa entre as lesões em HPV positivos e HPV negativos foi utilizado o teste do Qui-Quadrado de homogeneidade e independência, com valor de  $p < 0,05$ .

## Resultados:

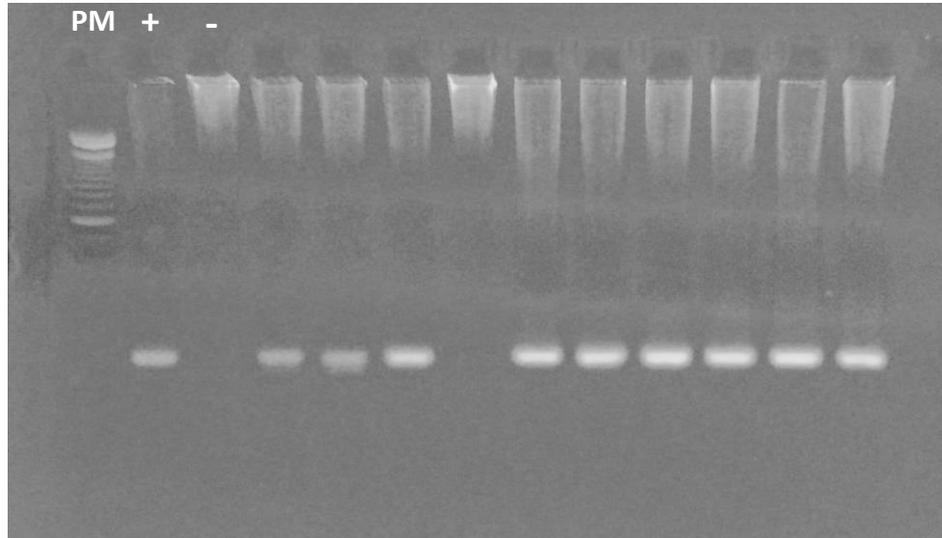
Nas 44 amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, observou-se uma prevalência de lavradores 11 (25%), do sexo masculino (68,2%), entre a quarta e a quinta década de vida (25%), feodermas (45,4%), apresentando a lesão neoplásica em região de língua (20,4%).

Após a realização dos processamentos laboratoriais, reação em cadeia da polimerase para identificação do gene da  $\beta$ -globina (Figura 2), e para detecção do DNA viral (Figura 3); e sequenciamento para genotipagem. Identificou-se que, em 63,6% (28) da amostra de câncer de cabeça e pescoço, existia infecção pelo PapilomaVírus Humano (Tabela I).

Figura 2. Gel de agarose a 2% mostrando bandas positivas para  $\beta$ -globina, usando os primers RS42/KM29; PM-Peso molecular; - Controle Negativo; + Controle Positivo.



**Figura 3** - Gel de agarose a 2% mostrando bandas positivas para HPV, após reação de *nested* PCR, usando os primers MY09/11, GP05/06; PM-Peso molecular; + Controle Positivo; - Controle Negativo.



O genoma do HPV foi detectado em nove amostras, nestas foram identificados apenas um genótipo envolvido na infecção, são eles: HPV 16 (33,3%), HPV 18 (22,2%), HPV 35 (22,2%), HPV 11 (11,1%) e HPV 90 (11,1%). Este reduzido número resultante do sequenciamento, deveu-se ao DNA altamente degradado nas demais amostras, o que impossibilitou a identificação do genoma viral.

Quanto à localização do tumor, a língua com 28,6% (8) foi o sítio de maior positividade para o vírus. Seguido das regiões de orofaringe (21,5%), soalho de boca (10,7%) e palato (10,7%). (Tabela II)

Tabela I - Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- aplicando o teste de qui-quadrado ao nível de significância de 5%.

<b>Carcinoma Oral</b>			
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>Valor de p</b>
HPV +	28	63,6%	0,07
HPV -	16	36,4%	
<b>TOTAL</b>	44	100%	

\*p<0,05 diferença estatística significativa

Tabela II – Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- nas diferentes localizações do carcinoma.

<b>Localização Da Neoplasia</b>	<b>HPV+</b>		<b>HPV-</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Língua	8	28,6%	1	6,25%
Soalho De Boca	3	10,7%	1	6,25%
Laringe	4	14%	3	18,75%
Mandíbula intra-ósseo	0	0%	3	18,75%
Palato	3	10,7%	1	6,25%
Orofaringe	6	21,5%	2	12,50%
Região retromolar	1	3,6%	2	12,50%
Rinofaringe	0	0%	1	6,25%
Lábio	1	3,6%	0	0%

Mucosa Jugal	1	3,6%	2	12,5%
Glândula Salivar	1	3,6%	0	0%
<b>TOTAL</b>	28	100%	16	100%

---

O perfil epidemiológico observado para os pacientes com HPV, apresentou um predomínio entre mulheres (60,7%), do lar (25%), feodermas (53,6%), na faixa etária entre a quarta e a quinta década de vida (32,1%). Etilismo e tabagismo foi relatado por 21,4% (6) e 25% (7) respectivamente (Tabela III). A maioria dos investigados eram ex tabagistas (15 - 53,6%) e ex etilistas (9 - 32,1%). Os presentes dados são apresentados nas tabelas que se seguem.

Tabela III - Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- aplicando o *Odds Ratio* ao nível de significância de 5%, para os diferentes gêneros e hábitos.

	HPV+		HPV-		OR	Valor de p
	N	%	N	%		
<b>Gênero</b>						
Feminino	17	60,7%	6	62,5%	2,57	0,142
Masculino	11	39,3%	10	37,5%		
<b>Etilista</b>						
Sim	6	21,4%	1	6,25%	4,09	0,212
Não	22	78,6%	15	93,75%		
<b>Fumante</b>						

Sim	7	25%	2	12,5%	2,33	0,331
Não	21	75%	14	87,5%		

---

\*p<0,05 diferença estatística significativa

Tabela IV – Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- nas diferentes ocupações.

Ocupação	HPV+		HPV-	
	N	%	N	%
Lavrador	6	21,2%	7	43,75%
Estudante	1	3,6%	1	6,25%
Balconista	0	0%	1	6,25%
Gari	0	0%	1	6,25%
Comerciante	0	0%	1	6,25%
Pescador	0	0%	1	6,25%
Sapateiro	0	0%	1	6,25%
Malhador	1	3,6%	0	0%
Do Lar	7	25%	0	0%
Não Consta	1	3,6%	0	0%
Desempregado	1	3,6%	1	6,25%
Ambulante	1	3,6%	0	0%
Refrigeração	1	3,6%	0	0%
Autônomo	1	3,6%	0	0%

Servente	1	3,6%	0	0%
Técnico Agrícola	1	3,6%	0	0%
Motorista	1	3,6%	0	0%
Aposentado	1	3,6%	1	6,25%
Técnica Em Enfermagem	1	3,6%	0	0%
Vigilante	1	3,6%	0	0%
Pedreiro	2	7%	1	6,25%
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>		<b>16</b>	

Tabela V - Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- aplicando o teste de qui-quadrado ao nível de significância de 5% nas diferentes raças.

<b>Raça</b>	<b>HPV+</b>		<b>HPV-</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
Melanoderma	6	21,4%	8	50%
Leucoderma	7	25%	2	12,5%
Feoderma	15	53,6%	6	37,5%
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>	<b>100%</b>	<b>16</b>	<b>100%</b>

Tabela VI – Frequência absoluta e percentual dos pacientes HPV+ e HPV- nas diferentes faixas etárias.

<b>Idade</b>	<b>HPV+</b>		<b>HPV-</b>	
	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
< 30	1	3,6%	2	12,5%
31- 49	9	32,1%	2	12,5%

50 – 59	7	25%	4	25
60 – 69	6	21,4%	3	18,75%
70 – 79	5	17,9%	3	18,75%
> 80	0	0%	2	12,5%
<b>TOTAL</b>	28	100%	16	100%

---

Através do teste Qui Quadrado, não foram encontradas nenhuma significância estatística entre os grupos HPV + e HPV -, apresentando um valor de  $p=0,07$  (Tabela I). Também foi aplicado o *Odds Ratio*, observando as chances do HPV ocorrer na amostra coletada, no que diz respeito ao sexo e hábitos. Verificou-se que a chance é sempre maior no grupo do sexo feminino, etilistas e tabagistas. Contudo, quando se tratou de indivíduos ex etilistas e/ou ex tabagistas, as chances de desenvolvimento da infecção pelo vírus reduzia (Tabela I).

#### **Discussão:**

O HPV tem sido debatido na literatura como um dos possíveis fatores responsáveis pelo desenvolvimento do câncer oral, além de fatores como a imunossupressão, dieta, genética, exposição excessiva ao sol, consumo de álcool e tabaco. O HPV, quando recorrente, pode promover a inativação do ciclo celular, levando a um meio propício para o desenvolvimento de neoplasias (ALBRING et al., 2006; ANTONSSON et al., 2015; CHEN et al., 2012; KULKARNI et al., 2011; ST GUILY et al., 2011) (ACAY et al., 2008; WATSON et al., 2013) (AGARWAL et al., 2011).

Vale ressaltar que o álcool e o tabaco são fatores sinérgicos. O álcool cria um meio propício, proporcionando que os efeitos tóxicos do tabaco levem ao desenvolvimento de

alterações celulares que desenvolvem a neoplasia (ALBRING et al., 2006; ANTONSSON et al., 2015; CHEN et al., 2012; KULKARNI et al., 2011; ST GUILY et al., 2011), esses artigos vem a corroborar nosso estudo uma vez que 53,6% dos pacientes relataram ser ex-tabagistas e 32,1% relatam ser ex etilistas, dados esses já encontrados pela OMS e inúmeros outros artigos na área de câncer oral. Vale ressaltar, que os pacientes ora acometidos pela patologia, após o diagnóstico da mesma, abandonam o vício no momento de iniciar o tratamento. Fato este que pode ser observado com este elevado número de ex tabagistas e ex etilistas.

Ainda no presente estudo, 78,6% (22) dos pacientes HPV positivos abordados não eram etilistas e 75% (21) não eram tabagistas, o que dá margem a se pensar em uma possibilidade de desenvolvimento da lesão pelo fator presença de oncovírus.

Dado importante se observa quando se aplica o *Odds Ratio* nos dados encontrados referente aos hábitos tabagistas e etilistas. Para os primeiros, observa-se que há duas vezes mais chances de um indivíduo que fuma desenvolver a infecção pelo vírus, do que não tabagistas. Já em relação aos etilistas, estes possuem quatro vezes mais chances de contrair a infecção pelo vírus, do que não etilistas.

Clinicamente, as neoplasias se apresentam na região de língua, como uma lesão eritro-leucoplásica assintomática, embora nos casos mais avançados haja evidências de úlceras e nódulos irregulares com bordas endurecidas (BAGAN; SARRION; JIMENEZ, 2010). O presente estudo com 44 pacientes identificou, em 20,4% das amostras, a língua como principal sítio de acometimento da lesão cancerígena, seguida de laringe com 18% dos casos, esses dados vem de encontro com a prevalência de câncer de boca já publicados pela OMS, uma vez que a língua certamente é o local mais acometido por esta patologia, após verificar que nos pacientes que apresentam positividade para HPV essa percentagem subir de 20,4% para 28,6%, esses dados demonstram uma maior propensão dos pacientes HPV positivos

apresentarem essa patologia na língua, indicando uma possível relação causa efeito nesta área anatômica que em outras, dados esses que se contrapõem a literatura.

Em se tratando da lesão associada ao vírus HPV, a mesma se destaca pela localização preferencialmente na orofaringe, base de língua, e nasofaringe (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; ARBABI-KALATI et al., 2014; ST GUILY et al., 2011; YANG; HUANG; KO, 2013). Cerca de 25% dos casos de câncer de orofaringe e 50% dos casos de câncer de amígdala, têm como causadores a infecção pelo vírus HPV, apresentando assim história natural e patogênese diferentes do habitual, melhorando as perspectivas para o prognóstico (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; ST GUILY et al., 2011). Na presente casuística, dos 28 indivíduos que portavam a neoplasia, e eram HPV positivo, 21,5% (6) apresentavam-na em região de orofaringe, e 14% (4) em laringe; sendo a prevalência na região de língua, 28,6% (8). Observa-se estudos que explanam a prevalência do câncer na orofaringe (45,5%), seguido pela laringe (18,2%) (YANG; HUANG; KO, 2013), esses dados nos remetem a direcionar novas pesquisas focando a área se língua como região anatômica a ser estudada, afim de, identificar essa relação entre o HPV e o câncer de boca.

Sendo estas lesões atribuídas aos tipos de alto potencial oncogênico 16 e 18 (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010). Autores trazem 57% dos indivíduos portadores de carcinoma de células escamosas HPV positivos (ST GUILY et al., 2011).

Em trabalho que analisou 65 casos, 14 apresentaram positividade para o vírus (CHEN et al., 2012), enquanto que em estudo avaliando 409 casos de pacientes com a neoplasia, 24 apresentaram positividade para o vírus (LINGEN et al., 2013). Em contrapartida, houve manuscritos apresentando um acometimento de 70,6% de sua amostra (KULKARNI et al., 2011), o que corrobora com nosso estudo, que apresentou semelhantes resultados quanto a presença deste tipos oncogênicos, no entanto, não se avaliou se os pacientes estudados

apresentavam ou já apresentaram, em algum momento da vida, lesões na região pélvica ou associações.

Há mais de 150 tipos virais catalogados, que variam conforme seu tropismo e genótipos, em: risco desconhecido; baixo risco, mais comumente os tipos 6 e 11, os responsáveis pelo desenvolvimento de lesões benignas, como os condilomas e verrugas vulgares; e os de alto risco, os relacionados às lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, dos quais se destacam os tipos 16 e 18 (ALBRING et al., 2006; ST GUILY et al., 2011). Os pacientes coletados no presente estudo não apresentavam lesões características de HPV, como condilomas, apenas lesões neoplásicas de câncer de cabeça e pescoço. Das 28 amostras HPV positivas, apenas 09 puderam ser sequenciadas, uma vez que o DNA se apresentou altamente degradado durante tentativa de sequenciamento. Dessa forma, os genótipos resultantes nessas nove amostras foram: HPV 16 (33,3%, 3/9), HPV 18 (22,2%, 2/9), HPV 35 (22,2%, 2/9), HPV 11 (11,1%, 1/9) e HPV 90 (11,1%, 1/9).

Assim, o genótipo prevalente foi o HPV 16, seguido do 18, tipos virais oncogênicos corroborando com a literatura que aponta que pelo menos 50% dos indivíduos HPV positivos em mucosa oral se infectam com o HPV de alto risco (ARBABI-KALATI et al., 2014; JOO et al., 2013). Em estudo com 721 amostras, 96,1% havia prevalência do HPV 16 (ANG; STURGIS, 2012). Concordando com demais autores da literatura que encontraram o mesmo genótipo nos seus achados (KULKARNI et al., 2011; LINGEN et al., 2013; ST GUILY et al., 2011)

Os casos em que não foi possível realizar a genotipagem nas amostras, pode se justificar pela coleta das células serem feitas por citologia esfoliativa, o que se observa é que através dessa técnica, a captura das células é muito superficial; considera-se que amostras

frescas e congeladas conservam melhor o DNA do que amostras de esfoliação (VIETÍA et al., 2014).

A degradação do DNA que impossibilitou o processo de sequenciamento, não pôde ser justificada por meios práticos, contudo, sugere-se que algum componente presente nas células escamosas orais inibe a reação, tal como as imunoglobulinas presentes na saliva ou ainda a presença de microrganismos bucais, fato este que, impossibilitou que mais amostras fossem genotipadas, no entanto, pode-se verificar a alta presença deste vírus nos casos estudados. Na literatura não se pode observar ocorrência semelhante, desta forma estudos acerca de tal acontecimento devem ser realizados para melhor entendimento.

A infecção oral pode ocorrer em qualquer idade, (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; SNIETURA et al., 2011; ST GUILY et al., 2011). Contudo, alguns autores relatam a infecção pelo HPV oral prevalente em adultos jovens, devido a fase ser caracterizada como sexualmente ativa (ARBABI-KALATI et al., 2014; PUKKALA; SIIDERHOLM; LINDQVIST, 1994; ST GUILY et al., 2011). Outros observaram prevalência na sexta década de vida (ST GUILY et al., 2011), corroborando trabalhos de outros autores (JOO et al., 2013; LINGEN et al., 2013). Geralmente o perfil do portador é adultos jovens, do sexo masculino, caucasianos, não tabagistas e sexualmente ativos (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; SNIETURA et al., 2011; ST GUILY et al., 2011). O perfil epidemiológico dos pacientes dessa amostra foi feodermas (53,6%, 15/28), em uma faixa etária entre a quarta e a quinta década de vida (21,4%, 9/28).

Em relação ao sexo, alguns autores relataram o sexo feminino como o mais acometido, com 80% dos casos (ST GUILY et al., 2011). Já outros apresentaram 63 casos masculino para 1 feminino (JOO et al., 2013), enquanto alguns observaram um total de 21 homens infectados, para 3 mulheres (LINGEN et al., 2013), discordando com a presente casuística na qual a

prevalência foi de mulheres (60,7%, 17/28), do lar (25%, 7/28). Vale considerar que nessa amostra, ao aplicar o *Odds Ratio*, obteve-se que no sexo feminino há duas vezes mais chances de se infectar com o HPV, do que no sexo masculino. Fato este que pode ser explicado pela associação com demais fatores causais associados, tais como a utilização de anticoncepcional oral, bem como a presença de outras doenças sexualmente transmissíveis (principalmente Chlamydia e Herpes genital), inflamação crônica, imunossupressão e paridade, o que é relatado em trabalho de coorte e corte transversal (TROTIER; FRANCO, 2006)

Apesar da necessidade de se saber a taxa de estadiamento para se planejar o tratamento e estabelecer o prognóstico, observa-se que os portadores de cânceres decorrentes por infecção por HPV, a depender do estágio do tumor, possuem sobrevida maior, após instituído o tratamento, seja ele qual for há uma melhor resposta, por parte do paciente, considerando que os carcinomas decorrentes do vírus HPV são mais radio e quimiossensíveis (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; BIRON; O'CONNELL; SEIKALY, 2013; ST GUILY et al., 2011), análise esta que não pôde ser verificada nesta pesquisa, pois alguns pacientes ao longo do estudo vieram a óbito, bem como, necessário seria um acompanhamento a longo prazo para se definir a sobrevida dos pacientes HPV positivos em relação aos HPV negativos.

Há aspectos citológicos de grande valia para a avaliação da presença do vírus HPV nos indivíduos, tais como: a disqueratose, binucleação e multinucleação; além da coilocitose, dessa forma, à medida que a lesão se maligniza, o DNA do vírus deixa de ser circular e passa a ser linear, se incorporando ao DNA da célula hospedeira (ALBRING et al., 2006). Na presente amostra, não foi possível se observar tais características, uma vez que não se teve acesso aos laudos histopatológicos de todos os pacientes, embora os que esse acesso foi possibilitado, não se identificou a presença das alterações supracitadas.

Sabe-se que o diagnóstico para HPV é feito por detecção do DNA viral nas células infectadas através de técnicas de biologia molecular (CHEN et al., 2012; IQBAL et al., 2014; RIET; RIVERO; NUNES, 2006), além da técnica de hibridização *in situ* para detecção do HPV oral por meio de amostras fixadas em blocos de parafina. A PCR tem se apresentado como uma técnica mais precisa, em tempo real e com baixos valores preditivos negativos (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010). Corroborando com a literatura, neste estudo foi instituída a técnica *nested* PCR, utilizando os primers MY09/MY11 e GP05/GP06 (ADELSTEIN; RODRIGUEZ, 2010; CHATURVEDI et al., 2011; DURZY et al., 2011; RIET; RIVERO; NUNES, 2006; SALAZAR et al., 2014).

O papel do HPV na progressão do câncer do epitélio oral permanece controverso, uma vez que os estudos apenas sugerem essa associação (VIETÍÁ et al., 2014; YANG; HUANG; KO, 2013). No teste Qui Quadrado realizado neste trabalho, teve-se um valor de  $p=0,07$ , ou seja, valor de  $p>0,05$ , rejeitando a hipótese de que as frequências diferiam entre os grupos (HPV positivos e HPV negativos). A relação não se faz tão forte quanto a existente no colo uterino, na região de cabeça e pescoço os resultados têm sido inconsistentes (VIETÍÁ et al., 2014; YANG; HUANG; KO, 2013). No entanto, verificou-se que um aumento no número amostral possa convergir para diferenças significativas, apontando que os pacientes HPV positivos possam ter uma relação entre o câncer oral, mais especificamente em região de língua.

Assim, apesar dos valores percentuais mostrarem que houve prevalência de indivíduos HPV positivos, 63,6% (28), estatisticamente não foi significativa, como em tantas outras pesquisas da literatura. Vale ressaltar que, faz-se necessário considerar a imunidade humoral dos indivíduos que foram estudados, pois alguns deles podem possuir baixa no sistema imunológico, que propiciem o estabelecimento da infecção produtiva pelo HPV viral, ou

mesmo resistência inibindo esse contágio. Como se trata de pacientes que possuem uma patologia extenuante, inúmeros pacientes que se encontravam em tratamento desta patologia apresentavam indicativos clínicos de debilidade.

### **Agradecimentos**

À agência financiadora da bolsa da mestranda Juliana da Silva Barros Cedraz, FAPITEC (Fundação de Apoio à Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe).

Aos laboratórios onde as amostras foram processadas: Laboratório de Entomologia e Parasitologia Tropical (LETP) da Universidade Federal de Sergipe - Brasil e Laboratório de Imunopatologia da relação Maternal-Fetal do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina na São Paulo Universidade do Estado - UNESP, Botucatu - Brasil.

### **Considerações Finais**

1 - 63,6% (28) apresentaram o vírus HPV, dos quais 9 foram tipados, resultando nos genótipos HPV 16, HPV 18, HPV 35, HPV 11 e HPV 90.

2 - Houve uma prevalência do HPV positivo em indivíduos sexo feminino, do lar, feodermas, entre a quarta e a quinta década de vida, apresentando a lesão neoplásica na região de língua.

3 - Os resultados demonstram que não houve significância estatística ( $p=0,07$ ), não apresentando relação de causa efeito entre o HPV e o câncer de cabeça e pescoço.

## Referências:

1. Iqbal A, Warraich R, Udeabor S, Rana M, Eckardt A, Gellrich N-C. Iqbal, 2013. Oral Dis. 2014;20(3):288–93.
2. Chen S-F, Yu F-S, Chang Y-C, Fu E, Nieh S, Lin Y-S. Su-Feng-Chen, 2011. J Oral Pathol Med. 2012;41(1):9–15.
3. Kulkarni SS, Kulkarni SS, Vastrad PP, Kulkarni B, Markande AR, Kadakol GS, et al. Prevalence and Distribution of High Risk Human Papillomavirus ( HPV ) Types 16 and 18 in Carcinoma of Cervix , Saliva of Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma and in the General Population in Karnataka , India Abstract. 2011;12:645–8.
4. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. Oral Oncol. Elsevier Ltd. 2013;49(1):1–8.
5. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer : Clinical features. Oral Oncol [Internet]. Elsevier Ltd. 2010;46(6):414–7.
6. Arbabi-kalati F, Nosratzahi T, Bameri Z, Rigi FM. Detection of Salivary Human Papilloma Viruses 16 and 18 ( HPV ) in Smoker Men in an Iranian Population by PCR : A Pilot Study. High Risk Behav Addict. 2014;3(3).
7. Agarwal a. K, Sethi A, Sareen D, Dhingra S. Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Our Population: The Clinic-Pathological and Morphological Description of 153 Cases. Int J Morphol. 2011;29(3):686–93.
8. Soares CP, Inácio R, Neves KA, Antonio J, Zuanon S, Neto CB, et al. Presença do papilomavirus humano em lesões malignas de mucosa oral Presence of human

- papillomavirus in malignant oral lesions. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(5):439–44.
9. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control.* 2010;21(9):1369–78.
  10. Antonsson A, Neale RE, Boros S, Lampe G, Coman WB, Pryor DI, et al. Human papillomavirus status and p16 INK4A expression in patients with mucosal squamous cell carcinoma of the head and neck in Queensland , Australia. *Cancer Epidemiol. Elsevier Ltd.* 2015;39(2):1–8.
  11. St Guily JL, Clavel C, Okaïs C, Prétet J-L, Beby-Defaux A, Agius G, et al. Human papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers. *Head Neck Oncol. BioMed Central Ltd.* 2011;3(1):6.
  12. Albring L, Brentano JE, Regina V, Vargas A. O câncer do colo do útero , o Papilomavírus Humano ( HPV ) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas Guarani : estudo de revisão The cervical cancer , the Human Papillomavirus and its risk factors and the Guarani indigenous women : a review. *Rev Bras Análises Clínicas.* 2006;38(2):87–90.
  13. Leite CA, Acay RR, Reche M, Guilherme O, Machado SO. Detecção do papilomavírus humano em lesões verrucosas orais por meio da técnica de hibridização in situ. 2008;237–43.
  14. Quintero K, Giraldo G a, Uribe ML, Baena A, Lopez C, Alvarez E, et al. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013;79(3):375–81.
  15. Hubbard RA. Human Papillomavirus Testing Methods. *Arch Pathol Lab Med.*

- 2003;127.
16. Arthur AE, Duffy S a, Sanchez GI, Gruber SB, Terrell JE, Hebert JR, et al. Higher micronutrient intake is associated with human papillomavirus-positive head and neck cancer: a case-only analysis. *Nutr Cancer*. 2011;63(5):734–42.
  17. Rodrigo JP, Hermsen MA, Fresno MF, Brakenhoff RH, Snijders PJF, Garcı F, et al. Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain. *Int J Cancer Epidemiol Detect Prev*. 2015;39:37–41.
  18. Daley E, Dodd V, Debate R, Vamos C, Wheldon C, Kline N, et al. Prevention of HPV-related oral cancer : assessing dentists ’ readiness. *Public Health*. Elsevier Ltd; 2014;128(3):231–8.
  19. Riet E, Rivero C, Nunes FD. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population : amplification by PCR HPV em carcinoma epidermóide de boca em população brasileira : amplificação por PCR. 2006;20(1):21–4.
  20. Broutian TR, He X, Gillison ML. Automated high throughput DNA isolation for detection of human papillomavirus in oral rinse samples. *J Clin Virol*. Elsevier B.V. 2011;50(4):270–5.
  21. Durzy J, Pacholska-bogalska J, Kaczmarek M, Han T, Durda M. HPV genotypes in the oral cavity / oropharynx of children and adolescents : cross-sectional survey in Poland. *Eur J Pediatr*. 2011;170(6):757–61.
  22. Acay RR, Santos E, Orsini S, Sousa M De. Correlation between c-Jun and human papillomavirus in oral premalignant and malignant lesions. *Oral Oncol*. 2008;44(7):698–702.
  23. Watson RF, Chernock RD, Wang X, Liu W, Ma XJ, Luo Y, et al. Spindle Cell Carcinomas of the Head and Neck Rarely Harbor Transcriptionally-Active Human

- Papillomavirus. *Head Neck Pathol.* 2013;7(3):250–7.
24. Adelstein DJ, Rodriguez CP. Human papillomavirus: Changing paradigms in oropharyngeal cancer. *Curr Oncol Rep.* 2010;12(2):115–20.
  25. Yang C, Huang C, Ko M. Human papillomavirus infection and papillary squamous cell carcinoma in the head and neck region. 2013;(123):301–7.
  26. Joo Y-H, Lee Y-S, Cho K-J, Park J-O, Nam I-C, Kim C-S, et al. Characteristics and prognostic implications of high-risk HPV-associated hypopharyngeal cancers. *PLoS One.* 2013;8(11):e78718.
  27. Vietia D, Liuzzi J, Ávila M, Guglielmo Z De, Prado Y, Correnti M. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinoma. *ECANCER.* 2014;8:1–8.
  28. Snietura M, Piglowski W, Jaworska M, Mucha-Malecka A, Wozniak G, Lange D, et al. Impact of HPV infection on the clinical outcome of p-CAIR trial in head and neck cancer. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology.* 2011;268(5):721–6.
  29. Pukkala E, Siiderholm A, Lindqvist C. Cancers of the Lip and Oropharynx in Different Social and Occupational Groups in Finland. 1994;30(3):209–15.
  30. Biron VL, O’Connell D a., Seikaly H. The impact of clinical versus pathological staging in oral cavity carcinoma - A multi-institutional analysis of survival. *J Otolaryngol - Head Neck Surg.* 2013;42:2–5.
  31. Chaturvedi AK, Engels E a, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4294–301.
  32. Salazar CR, Smith R V., Garg MK, Haigentz M, Schiff B a., Kawachi N, et al. Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Survival: A

- Comparison by Tumor Site and Initial Treatment. *Head Neck Pathol.* 2014;8(1):77–87.
33. Trottier, H.; Franco, E. L. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine.* 2006; 24(1):4–15.

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Dos 44 indivíduos estudados, 63,6% apresentaram o vírus HPV, havendo uma prevalência em indivíduos sexo feminino (60,7%), do lar (25%), feodermas (53,6%), entre a quarta e a quinta década de vida (21,4%), apresentando a lesão neoplásica na região de língua, 28,6%. Tais resultados por meio do Teste estatístico apresentou um valor de  $p=0,07$ , o que indica a ausência de significância estatística, não podendo relacionar o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço à infecção pelo Papilomavírus Humano – HPV.

## **6. COMUNICADO À IMPRENSA**

Esse estudo reflete acerca da infecção do Papiloma vírus Humano como possível agente para o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. Contudo a literatura aponta a existência de controvérsias nesta associação, principalmente por vislumbrar uma mudança de paradigmas na abordagem clínica atual para diagnóstico, tratamento e prevenção da neoplasia.

Essa associação se faz geralmente com os tipos virais de alto potencial oncogênico, tais como os tipos 16 e 18. Normalmente, quando se percebe a relação de causa-efeito entre ambas as condições, observa-se uma resposta positiva do indivíduo ao tratamento, uma vez

que as lesões decorrentes de tais vírus são quimio e radiosensíveis, melhorando o prognóstico e o índice de sobrevivência.

Dessa forma, o presente trabalho realizou uma relevante investigação na busca dos possíveis genótipos existentes em 44 pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço e atendidos em centros de referência da Bahia e Sergipe. Os mesmos apresentaram a neoplasia nas mais diversas regiões da cabeça e pescoço, desde a mucosa bucal, língua, lábio, orofaringe e rinofaringe. Os resultados revelaram que das 44 amostras, 28 apresentaram positividade para o vírus HPV, com predomínio dos tipos virais de alto risco.

Em algumas amostras positivas, o DNA foi impossibilitado de ser sequenciado, o que não permitiu a genotipagem. Sugere-se que tal fato tenha ocorrido devido a realização da coleta das células terem sido feitas por citologia esfoliativa, uma vez que se sabe que nessa técnica, a captura das células é muito superficial. Além disso, sugere-se que algum componente presente nas células escamosas orais inibe a reação, tal como as imunoglobulinas presentes na saliva ou ainda a presença de microrganismos bucais, fato este que não foi identificado na literatura estudada.

Com tais resultados não se pode estabelecer de fato uma inter-relação entre ambas as condições, pode-se sugerir uma possível relação, fato esse comprovado pelo teste estatístico do Qui Quadrado, o qual estabeleceu um valor de  $p=0,07$ , demonstrando que as frequências não diferem, sendo estatisticamente insignificantes.

Além disso, deve-se considerar outros fatores relacionados no desenvolvimento da neoplasia, tais como estilo de vida, estadiamento da lesão, biologia local e suas alterações celulares epigenéticas, provenientes de acúmulos genéticos adicionais, por agentes carcinogênicos ou mutagênicos, como, por exemplo: o uso do tabaco, associado ou não ao consumo excessivo de álcool.

O simples fato de ser portador do HPV não será suficiente para se definir o desenvolvimento da neoplasia. O presente trabalho abre caminhos para realização de novas pesquisas a fim de se obter resultados mais fidedignos que sedimentem o estudo em questão.

## **REFERÊNCIAS**

ACAY, R. R.; SANTOS, E.; ORSINI, S.; SOUSA, M. Correlation between c-Jun and human papillomavirus in oral premalignant and malignant lesions. **Oral Oncology**, v. 44, n. 7, p. 698–702, 2008.

ADELSTEIN, D. J.; RODRIGUEZ, C. P. Human papillomavirus: Changing paradigms in oropharyngeal cancer. **Current Oncology Reports**, v. 12, n. 2, p. 115–120, 2010.

AGARWAL, A. K.; SETHI, A.; SAREEN, D.; DHINGRA, S. Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma in Our Population: The Clinic-Pathological and Morphological Description of 153 Cases. **International Journal of Morphology**, v. 29, n. 3, p. 686–693, 2011.

ALBRING, L.; BRENTANO, J. E.; REGINA, V.; VARGAS, A. O câncer do colo do útero , o Papilomavírus Humano ( HPV ) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas Guarani : estudo de revisão The cervical cancer , the Human Papillomavirus and its risk factors and the Guarani indigenous women : a review. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 38, n. 2, p. 87–90, 2006.

ANTONSSON, A.; NEALE, R. E.; BOROS, S.; LAMPE, G.; COMAN, W. B.; PRYOR, D. I.; PORCEDDU, S. V.; WHITEMAN, D. C. Human papillomavirus status and p16 INK4A expression in patients with mucosal squamous cell carcinoma of the head and neck in Queensland , Australia. **Cancer Epidemiology**, v. 39, n. 2, p. 1–8, 2015.

ARBABI-KALATI, F.; NOSRATZEHI, T.; BAMERI, Z.; RIGI, F. M. Detection of Salivary Human Papilloma Viruses 16 and 18 ( HPV ) in Smoker Men in an Iranian Population by PCR : A Pilot Study. **High Risk Behav Addict**, v. 3, n. 3, 2014.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer : Clinical features. **Oral Oncology**, v. 46, n. 6, p. 414–417, 2010.

BIRON, V. L.; O'CONNELL, D. A.; SEIKALY, H. The impact of clinical versus pathological staging in oral cavity carcinoma - A multi-institutional analysis of survival. **Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery**, v. 42, n. APR, p. 2–5, 2013.

BLITZER, G. C.; SMITH, M. A.; HARRIS, S. L.; KIMPLE, R. J. Review of the Clinical and Biologic Aspects of Human Papillomavirus-Positive Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck. **Radiation Oncology Biology**, v. 88, n. 4, p. 761–770, 2014.

CHEN, S.-F. Su-Feng-Chen, 2011. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 1, p. 9–15, 2012.

CHUANG, S.-C. Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the Inhance consortium. **Cancer causes & control : CCC**, v. 23, n. 1, p. 69–88, jan. 2012.

COLON-LÓPEZ, V.; QUIÑONES-AVILA, V.; DEL TORO-MEJÍAS, L. M.; REYES, K.; RIVERA, M. E.; NIEVES, K.; SÁNCHEZ-VAZQUEZ, M. M.; MARTÍNEZ-FERRER, M.; ORTIZ, A. P. Oral HPV infection in a clinic-based sample of Hispanic men. **BMC oral health**, v. 14, p. 7, 2014.

DALEY, E.; DODD, V.; DEBATE, R.; VAMOS, C.; WHELDON, C.; KLINE, N.; SMITH, S.; CHANDLER, R.; DYER, K.; HELMY, H.; DRISCOLL, A. Prevention of HPV-related oral cancer : assessing dentists ' readiness. **Public Health**, v. 128, n. 3, p. 231–238, 2014.

DURZY, J.; PACHOLSKA-BOGALSKA, J.; KACZMAREK, M.; HAN, T.; DURDA, M. HPV genotypes in the oral cavity / oropharynx of children and adolescents : cross-sectional survey in Poland. **European Journal of Pediatrics**, p. 757–761, 2011.

ESQUENAZI, D.; FILHO, I. B.; CARVALHO, C.; SOUZA, F. A frequência do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio da PCR. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 76, n. 1, p. 78–84, 2010.

FILHO, I. B.; NASCIMENTO, V. X.; XAVIER, S. D. Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico positivo para HPV genital. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 5, p. 167–171, 2009.

GLOMBITZA, F.; GUNTINAS-LICHIUS, O.; PETERSEN, I. Pathology – Research and Practice HPV status in head and neck tumors. **Pathology Research and Practice**, v. 206, n. 4, p. 229–234, 2010.

GONZÁLEZ, A. P.; LÓPEZ, M. A. Comportamiento clínico y epidemiológico del cáncer de cavidad oral.

HUBBARD, R. A. Human Papillomavirus Testing Methods. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 127, n. August, 2003.

KARINE, A. Carcinoma Espinocelular da Cavidade Bucal : um Estudo Epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 229–236, 2009.

LEE, L.; HUANG, C. G.; LIAO, C. T.; LEE, L. Y.; HSUEH, C.; CHEN, T. C.; LIN, C. Y.; FAN, K. H.; WANG, H. M.; HUANG, S. F.; CHEN, I. H.; KANG, C. J.; NG, S. H.; YANG, S. L.; TSAO, K. C.; CHANG, Y. L.; YEN, T. C. Human Papillomavirus-16 Infection in Advanced Oral Cavity Cancer Patients Is Related to an Increased Risk of Distant Metastases and Poor Survival. **Plos One**, v. 7, n. 7, p. 7–9, 2012.

LINGEN, M. W.; XIAO, W.; SCHMITT, A.; JIANG, B.; PICKARD, R.; KREINBRINK, P.; PEREZ-ORDONEZ, B.; JORDAN, R. C.; GILLISON, M. L. 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.

MACHADO, J.; REIS, P. P.; ZHANG, T.; SIMPSON, C.; XU, W.; PEREZ-ORDONEZ, B.; GOLDSTEIN, D. P.; BROWN, D. H.; GILBERT, R. W.; GULLANE, P. J.; IRISH, J. C.; KAMEL-REID, S. Low prevalence of human papillomavirus in oral cavity carcinomas. **Head & neck oncology**, v. 2, p. 6, 2010.

MADANI, A. H. Cancer Informatics Relationship between Selected Socio-Demographic Factors and Cancer of Oral Cavity - A Case Control Study. **Cancer Informatics**, v. 9, p. 163–168, 2010.

MELO, M. R.; MARTINS, A. R.; ROMANO, P.; SHCOLNIK, W. Coleta , transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, p. 375–381, 2010.

MENDOZA, L.; MONGELOS, P.; PAEZ, M.; CASTRO, A.; RODRIGUEZ-RIVEROS, I.; GIMENEZ, G.; ARAUJO, P.; ECHAGÜE, G.; DIAZ, V.; LASPINA, F.; CASTRO, W.; JIMENEZ, R.; MARECOS, R.; EVER, S.; DELUCA, G. PICCONI, M. A. Human papillomavirus and other genital infections in indigenous women from Paraguay : a cross-sectional analytical study. **BMC infectious diseases**, v. 13, p. 531, 2013.

PATEL, S. G.; AMIT, M.; YEN, T. C.; LIAO, C. T.; CHATURVEDI, P.; AGARWAL, J. P.; KOWALSKI, L. P.; EBRAHIMI, A.; CLARK, J. R.; CERNEA, C. R.; BRANDAO, S. J.; KREPPPEL, M.; ZÖLLER, J.; FLISS, D.; FRIDMAN, E.; BACHAR, G.; SHPITZER, T.; BOLZONI, V.; PATEL, P. R.; JONNALAGADDA, S.; ROBBINS, K. T.; SHAH, J. P.; GIL,

Z. Lymph node density in oral cavity cancer: results of the International Consortium for Outcomes Research. **British journal of cancer**, v. 109, n. 8, p. 2087–95, 2013.

PINHEIRO, R. S.; FRANC, T. R.; ROCHA, B.; FERREIRA, D. C.; MARIA, C.; RIBEIRO, B.; MARIA, S.; CAVALCANTI, B.; POMARICO, I.; SOUZA, R.; LEA, J. C.; FERNANDA, G.; CASTRO, B. Human papillomavirus coinfection in the oral cavity of. **J Clin Pathol**, v. 64, p. 1083–1088, 2011.

PINTOS, J.; BLACK, M. J.; SADEGHI, N.; GHADIRIAN, P.; ZEITOUNI, A. G.; VISCIDI, R. P.; HERRERO, R.; FRANCO, E. L. Human papillomavirus infection and oral cancer : A case-control study in Montreal , Canada. **Oral Oncology**, v. 44, n. 3, p. 242–250, 2008.

QUINTERO, K.; GIRALDO, G.; URIBE, M. L.; BAENA, A.; LOPEZ, C.; ALVAREZ, E.; SANCHEZ, G. I. Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 79, n. 3, p. 375–81, 2013.

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

SALAZAR, C. R.; SMITH, R. V.; GARG, M. K.; HAIGENTZ, M.; SCHIFF, B.; KAWACHI, N.; ANAYANNIS, N.; BELBIN, T. J.; PRYSTOWSKY, M. B.; BURK, R. D.; SCHLECHT, N. F. Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Survival: A Comparison by Tumor Site and Initial Treatment. **Head and Neck Pathology**, v. 8, n. 1, p. 77–87, 2014.

SANTOS, G. L. et al. Fumo e álcool como fatores de risco para o câncer bucal Tobacco and alcohol as risk factors for buccal cancer. **Odontol. Clín.-Cient.**, v. 9, n. 2, p. 131–133, 2010.

SMITH, E. M.; RUBENSTEIN, L. M.; HAUGEN, T. H.; HAMSIKOVA, E.; TUREK, L. P .

Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. **Cancer causes & control : CCC**, v. 21, n. 9, p. 1369–78, set. 2010.

SOARES, C. P.; INÁCIO, R.; NEVES, K. A.; ANTONIO, J.; ZUANON, S.; NETO, C. B.; SPOLIDÓRIO, L. C.; RITA, M.; OLIVEIRA, B. Presença do papilomavirus humano em lesões malignas de mucosa oral Presence of human papillomavirus in malignant oral lesions. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 439–444, 2002.

SOARES, R. C.; OLIVEIRA, M. C.; SOUZA, L. B.; COSTA, A. L.; MEDEIROS, S. R. B.; PINTO, L. P. Human papillomavirus in oral squamous cells carcinoma in a population of 75 Brazilian patients. **American journal of otolaryngology**, v. 28, n. 6, p. 397–400, 2007.

ST GUILY, J. L.; OKAĚS, C.; PRÉTET, J. L.; BEBY-DEFAUX, A.; AGIUS, G.; BIREMBAUT, P.; JACQUARD, A. C.; LÉOCMACH, Y.; SOUBEYRAND, B.; RIETHMULLER, D.; DENIS, F.; MOUGIN, C. Human papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers. **Head & neck oncology**, v. 3, n. 1, p. 6, jan. 2011.

TUCCI, R.; HENRIQUE, P.; CASTRO, S. Avaliação de 14 casos de carcinoma epidermoide de boca com diagnóstico tardio Evaluation of 14 cases of oral squamous cell carcinoma with delayed diagnosis. **Revista Sul-Brasileira de Odontologia**, v. 7, n. 2, p. 231–8, 2009.

TURNER, D. O.; WILLIAMS-COCKS, S. J.; BULLEN, R.; CATMULL, J.; FALK, J.; MARTIN, D.; MAUER, J.; BARBER, A. E.; WANG, R. C.; GERSTENBERGER, S. L.; KINGSLEY, K. High-risk human papillomavirus ( HPV ) screening and detection in healthy patient saliva samples : a pilot study. **BMC Oral Health**, v. 11, n. 1, p. 28, 2011.

VIETÍA, D.; LIUZZI, J.; ÁVILA, M.; GUGLIELMO, Z.; PRADO, Y.; CORRENTI, M. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinoma. **ECANCER**, v. 8, p. 1–8, 2014.

XAVIER, S. D.; FILHO, I. B.; CARVALHO, J. M.; MARIA, V.; FRAMIL, S.; MARIA, T.;

PATURY, P.; CASTRO, G. Frequência de Aparecimento de Papilomavírus Humano ( HPV ) na Mucosa Oral de Homens com HPV Anogenital Confirmado por Biologia Molecular  
Frequency of Appearance of Human Papillomavirus ( HPV ) in Oral Mucosa of Men with Anogenital HPV by a Molecular Techn. **Arq Int Otorrinolaringol**, v. 11, n. 1, p. 36–44, 2007.

## APÊNDICE 1

### PARECES CONSUBSTANCIADOS DO COMITÊ DE ÉTICA

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE  
ARACAJÚ/ UNIVERSIDADE  
FEDERAL DE SERGIPE/ HU-



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

**Pesquisador:** cleverson luciano trento

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 36923114.6.0000.5548

**Instituição Proponente:**

**Patrocinador Principal:** FUNDACAO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 830.417

**Data da Relatoria:** 10/10/2014

##### Apresentação do Projeto:

O projeto pretende estudar o carcinoma de células escamosas, que é uma neoplasia genética, complexa e multifatorial de alta morbimortalidade e que continua a ter uma incidência global elevada. Sua etiologia está relacionada a exposição a alguns fatores de risco, tais como, os habituais consumo de álcool e tabaco; e a influência de fatores extrínsecos, como a genética, e a contaminação por oncovírus, como o Papiloma Vírus Humano, HPV. Este se caracteriza por ser epiteliotrófico e atua na desregulação da atividade celular pela ligação das suas oncoproteínas à parede da célula hospedeira. Assim ocorre diminuição da capacidade de supressão tumoral e aumento do crescimento da célula infectada, o vírus se distribui de forma homogênea, levando a uma maior possibilidade de malignização celular.

##### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Analisar a presença e o tipo mais frequente de Papilomavírus Humano (HPV) em amostras bucais de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas.

**Endereço:** Rua Claudio Batista s/n°  
**Bairro:** Sanatório **CEP:** 49.060-110  
**UF:** SE **Município:** ARACAJU  
**Telefone:** (79)2105-1805 **E-mail:** cephu@ufs.br

Página 01 de 04

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

**Pesquisador:** cleverson luciano trento

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 38923114.6.0000.5546

**Instituição Proponente:**

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE APOIO A PESQUISA E A INOVAÇÃO TECNOLÓGICA DO ESTADO DE SERGIPE  
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 003.774

**Data da Relatoria:** 04/12/2014

**Apresentação do Projeto:**

O projeto pretende estudar o carcinoma de células escamosas, que é uma neoplasia genética, complexa e multifatorial de alta morbimortalidade e que continua a ter uma incidência global elevada. Sua etiologia está relacionada a exposição a alguns fatores de risco, tais como, os habituais consumo de álcool e tabaco; e a influência de fatores extrínsecos, como a genética, e a contaminação por oncovírus, como o Papiloma Vírus Humano, HPV. Este se caracteriza por ser epiteliotrófico e atua na desregulação da atividade celular pela ligação das suas oncoproteínas à parede da célula hospedeira. Assim ocorre diminuição da capacidade de supressão tumoral e aumento do crescimento da célula infectada, o vírus se distribui de forma homogênea, levando a uma maior possibilidade de malignização celular.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Analisar a presença e o tipo mais frequente de Papilomavírus Humano (HPV) em amostras bucais de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas.

**Endereço:** Rua Cláudio Batista s/n°  
**Bairro:** Sanatório **CEP:** 49.060-110  
**UF:** SE **Município:** ARACAJU  
**Telefone:** (79)2105-1805 **E-mail:** cephu@ufs.br

## APÊNDICE 2



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA OS PESQUISADORES CONVIDADOS**

Queremos lhe convidar como pesquisador voluntário para participar do projeto **“GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS”**. A mesma tem como pesquisador responsável o professor doutor Cleverson Luciano Trento, e o professor doutor Silvio Santana Dolabella; e como equipe executora, a mestranda em Clínica Odontológica, Juliana da Silva Barros Cedraz, do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a presença do Papiloma Vírus Humano (HPV) na cavidade bucal de pacientes portadores de carcinoma bucal, fazendo-se uma associação entre as duas doenças, já que a literatura aponta sendo a primeira, fator extrínseco para o desenvolvimento da segunda.

Caso aceite o convite, poderá tanto disponibilizar o ambulatório do seu setor e ficar no posto de supervisão do trabalho da citada mestranda, ou mesmo participar ativamente da realização das etapas de desenvolvimento da pesquisa, como segue: Após abordagens aos pacientes, e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, será realizada

citologia esfoliativa na região da lesão, quando acessível, e áreas adjacentes. Esse processo será feito no ambulatório da disciplina Diagnóstico Bucal da Universidade Federal de Sergipe, bem como no Hospital de Urgência de Sergipe.

Posteriormente a amostra coletada, armazenada em tubos falcon contendo álcool 70°GL, será encaminhada para Laboratório de Entomologia e Parasitologia da Universidade Federal de Sergipe, a fim de se proceder a extração de DNA, detecção e genotipagem do Papiloma Vírus Humano. Após obtenção dos resultados, os dados serão tabulados e apresentados ao final da pesquisa.

Os riscos que podem existir, referem-se a exposição a compostos químicos tóxicos, que são minimizados com a utilização de EPI adequados; além da possibilidade de constrangimentos no momento de realizar a coleta na presença dos responsáveis pelo estudo, o que pode ser sanado por meio de diálogo. Vale ressaltar que os benefícios se referem a possibilidade de contribuir com uma pesquisa de grande relevância científica, uma vez que é uma temática ainda controversa na literatura. Desse modo, os resultados encontrados serão posteriormente submetidos a apreciação de periódicos de impacto científico.

Vale ressaltar a importância do cumprimento da Resolução CNS 466/12, que trata dos preceitos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos, resguardando dessa forma a segurança e bem estar dos sujeitos recrutados para a pesquisa. E, dessa forma, na sua função, enquanto pesquisador voluntário, deve comprometer-se a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no projeto.

Ressalta-se ainda que, a qualquer momento, você poderá se negar a dar continuidade ao estudo, sem qualquer dano. E poderá ser indenizado caso se sinta lesado em algum momento do desenvolvimento da pesquisa. No momento em que houver necessidade de

maiores informações acerca da pesquisa, poderá ser feito contato com um dos(as) pesquisadores (as) responsáveis na Universidade Federal de Sergipe.

Caso aceite participar do estudo, assine esse termo em duas vias. Uma fica com você e outra com os responsáveis pelo projeto.

Aracaju, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Assinatura da mestrandia: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador convidado: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Contatos do Coordenador do Projeto

Cleverson Luciano Trento

E-mail: cleverson@ufs.br

Telefone: 7921051823

Endereço: Rua Claudio Batista, S/N; 49.060-100 Aracaju

Campus do Hospital Universitário/Departamento de Odontologia/Ambulatório IV

## APÊNDICE 3



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**DEPARTAMENTO DE SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

### TERMO DE ACEITE

Aracaju, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014

**Ao Sr.** Cleverson Luciano Trento

Coordenador do projeto

Declaro que aceito o convite e autorizo a utilização das dependências odontológicas do Serviço de \_\_\_\_\_, em \_\_\_\_\_, como um dos campos de estudo do projeto de pesquisa intitulado “**PESQUISA E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS**” a ser desenvolvido pela mestrandia Juliana da Silva Barros Cedraz, do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe.

---

Assinatura do coordenador

## APÊNDICE 4



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**DEPARTAMENTO DE SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**TERMO DE COMPROMISSO**

Aracaju, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015

**Ao Sr.** Cleverson Luciano Trento

Coordenador do projeto

Eu, \_\_\_\_\_, declaro estar ciente da importância do cumprimento da Resolução CNS 466/12, que trata dos preceitos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos, resguardando dessa forma a segurança e bem estar dos sujeitos recrutados para a pesquisa. E, dessa forma, comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no projeto intitulado **“PESQUISA E GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS”**, a ser desenvolvido pela mestrandia Juliana da Silva Barros Cedraz, do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Sergipe.

---

Assinatura do participante

## APÊNDICE 5



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O PÚBLICO PARTICIPANTE DA AMOSTRA DO ESTUDO

O projeto “GENOTIPAGEM DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS”, tendo como pesquisador responsável o professor doutor Cleverson Luciano Trento, e o professor doutor Silvio Santana Dolabella; e como equipe executora, a mestranda em Clínica Odontológica, Juliana da Silva Barros Cedraz, objetiva avaliar a presença do Papiloma Vírus Humano (HPV) em pacientes portadores de câncer de boca.

Dessa forma, queremos lhe convidar para participar deste estudo, sem qualquer custo financeiro. Inicialmente, por meio de uma escova será feito um atrito na região da lesão e próxima a mesma. Essa amostra, presente na escova, é colocado em um tubo com álcool 70°GL e levada ao laboratório, onde se observará se há presença do vírus HPV. Inicialmente por meio de determinados procedimentos, extrai o DNA da amostra e depois avalia se existe o vírus presente. Em caso afirmativo, faz-se outro processamento laboratorial para identificar qual o tipo viral envolvido, se poderia ser considerado responsável pelo desenvolvimento da lesão.

Após obtenção dos resultados, se existe o vírus e qual o tipo, será elaborado um banco de dados, com todas as informações. Este documento será guardado em local de acesso apenas pelos pesquisadores; e os mesmos serão destruídos após cinco anos. Caso o participante queira ter o acesso, os mesmos poderão ser disponibilizados pela equipe após o estabelecimento de contato por telefone ou e-mail. Suas informações serão mantidas em sigilo, garantindo seu anonimato durante e após o estudo. As mesmas, só serão utilizadas para fins acadêmicos, através de revistas ou jornais de cunho científico para os profissionais da área. A qualquer momento, você poderá desistir de participar da pesquisa, sendo seus dados automaticamente excluídos do estudo, necessitando apenas entrar em contato com os (as) pesquisadores (as) responsáveis.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**

**DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**CONTINUAÇÃO DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Os riscos que podem ser observados no desenvolvimento do estudo, e que deverão ser evitados, referem-se ao possível medo de expor ideias, ou a não compreensão à linguagem estabelecida entre o participante e os pesquisadores. Assim o participante terá direito a indenização caso houverem comprovadamente danos causados pela presente pesquisa. Contudo, tais danos podem ser minimizados através da solicitação de maiores esclarecimentos em caso de qualquer dúvida; além disso deve-se considerar que há o benefício de se avaliar o nível de associação da infecção pelo vírus do HPV e o desenvolvimento do câncer de boca, o que contribuirá para uma melhor abordagem e conduta em relação ao paciente portador da doença.

Caso concorde em participar da pesquisa, você e o(a) pesquisador(a) assinarão este termo em duas vias; uma ficará com você e a outra com o pesquisador.

Aracaju, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Assinatura do participante: \_\_\_\_\_

Assinatura do pesquisador responsável: \_\_\_\_\_

Contatos do Coordenador do Projeto

Cleverson Luciano Trento E-mail: cleveson@ufs.br Telefone: 7921051823

Endereço: Rua Claudio Batista, S/N; 49.060-100 Aracaju

Campus do Hospital Universitário/Departamento de Odontologia/Ambulatório IV

## APÊNDICE 6



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

### FICHA DE COLETA DE DADOS SECUNDÁRIOS

NOME: \_\_\_\_\_ NÚMERO DO PRONTUÁRIO: \_\_\_\_\_  
SEXO: \_\_\_F\_\_\_ \_\_\_M\_\_\_ IDADE: \_\_\_\_\_ DATA DE NASCIMENTO: \_\_\_\_\_  
COR: \_\_\_MELANODERMA\_\_\_ \_\_\_LEUCODERMA\_\_\_ \_\_\_XANTODERMA\_\_\_ \_\_\_FAIODERMA\_\_\_  
ESTADO CIVIL: \_\_\_\_\_ NATURALIDADE: \_\_\_\_\_ NACIONALIDADE \_\_\_\_\_  
ESCOLARIDADE: \_\_\_\_\_ OCUPAÇÃO: \_\_\_\_\_  
CONSUMO APENAS DE ÁLCOOL: \_\_\_S\_\_\_ \_\_\_N\_\_\_ CONSUMO APENAS DE TABACO: \_\_\_S\_\_\_ \_\_\_N\_\_\_  
CONSUMO DE ÁLCOOL E TABACO: \_\_\_S\_\_\_ \_\_\_N\_\_\_  
SE ABANDONOU O ÁLCOOL: \_\_\_S\_\_\_ \_\_\_N\_\_\_ SE ABANDONOU O TABACO: \_\_\_S\_\_\_ \_\_\_N\_\_\_  
TEMPO DE ABANDONO: \_\_\_\_\_  
LOCALIZAÇÃO DA LESÃO: \_\_\_\_\_ DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO (SE TIVER): \_\_\_\_\_

## APÊNDICE 7

### PROTOCOLO DO TET - Tris, EDTA, Tween 20 (TAMPÃO PARA DIGESTÃO)

TRIS \_\_\_\_\_ 50mM \_\_\_\_\_ pH=8,5

EDTA \_\_\_\_\_ 1Mm \_\_\_\_\_ pH=8 (solução estoque 0,25)

TWEEN 20 \_\_\_\_\_ 0,5%

Para 100mL:

- 1) Colocar 80 mL de água;
- 2) 0,6g de tris - usar o aminometano ultra puro;
- 3) Acertar o pH para 8,5 com HCl 2N;
- 4) Colocar 0,4 mL de EDTA e 0,5 mL de Tween 20;
- 5) Colocar a solução em uma garrafa, autoclavar e aliquotar.

## **ANEXO**

### **NORMAS DA REVISTA ANTICANCER RESEARCH**

#### **Instructions for Authors**

*General Policy.* ANTICANCER RESEARCH (AR) will accept original high quality works and reviews on all aspects of experimental and clinical cancer research. The Editorial Policy suggests that priority will be given to papers advancing the understanding of cancer causation, and to papers applying the results of basic research to cancer diagnosis, prognosis, and therapy. AR will also accept the following for publication: (a) Abstracts and Proceedings of scientific meetings on cancer, following consideration and approval by the Editorial Board; (b) Announcements of meetings related to cancer research; (c) Short reviews (of approximately 120 words) and announcements of newly received books and journals related to cancer, and (d) Announcements of awards and prizes.

The principal aim of AR is to provide prompt publication (print and online) for original works of high quality, generally within 1-2 months from final acceptance. Manuscripts will be accepted on the understanding that they report original unpublished works in the field of cancer research that are not under consideration for publication by another journal, and that they will not be published again in the same form. All authors should sign a submission letter confirming the approval of their article contents. All material submitted to AR will be subject to review, when appropriate, by two members of the Editorial Board and by one suitable outside referee. The Editors reserve the right to improve manuscripts on grammar and style.

The Editors and Publishers of AR accept no responsibility for the contents and opinions expressed by the contributors. Authors should warrantee due diligence in the creation and issuance of their work.

*NIH Open Access Policy.* The journal acknowledges that authors of NIH funded research retain the right to provide a copy of the final manuscript to the NIH four months after publication in ANTICANCER RESEARCH, for public archiving in PubMed Central.

*Copyright.* Once a manuscript has been published in ANTICANCER RESEARCH, which is a copyrighted publication, the legal ownership of all published parts of the paper has been transferred from the Author(s) to the journal. Material published in the journal may not be reproduced or published elsewhere without the written consent of the Managing Editor or Publisher.

*Format.* Two types of papers may be submitted: (i) Full papers containing completed original work, and (ii) review articles concerning fields of recognisable progress. Papers should contain all essential data in order to make the presentation clear. Reasonable economy should be exercised with respect to the number of tables and illustrations used. Papers should be written in clear, concise English. Spelling should follow that given in the “Shorter Oxford English Dictionary”.

*Manuscripts.* Submitted manuscripts should not exceed fourteen (14) pages (approximately 250 words per double - spaced typed page), including abstract, text, tables, figures, and references (corresponding to 4 printed pages). Papers exceeding four printed pages will be subject to excess page charges. All manuscripts should be divided into the following sections: (a) First page including the title of the presented work [not exceeding fifteen (15) words], full names and full postal addresses of all Authors, name of the Author to whom proofs are to be sent, key words, an abbreviated running title, an indication “review”, “clinical”, “epidemiological”, or “experimental” study, and the date of submission. (Note: The order of the Authors is not necessarily indicative of their contribution to the work. Authors may note their individual contribution(s) in the appropriate section(s) of the presented work); (b)

Abstract not exceeding 150 words, organized according to the following headings: Background/Aim - Materials and Methods/Patients and Methods - Results - Conclusion; (c) Introduction; (d) Materials and Methods/Patients and Methods; (e) Results; (f) Discussion; (g) Acknowledgements; (h) References. All pages must be numbered consecutively. Footnotes should be avoided. Review articles may follow a different style according to the subject matter and the Author's opinion. Review articles should not exceed 35 pages (approximately 250 words per double-spaced typed page) including all tables, figures, and references.

*Figures.* All figures should appear inline in the submitted document file. Once a manuscript is accepted all figures and graphs should be submitted separately in either jpg, tiff or pdf format and at a minimum resolution of 300 dpi. Graphs must be submitted as pictures made from drawings and must not require any artwork, typesetting, or size modifications. Symbols, numbering and lettering should be clearly legible. The number and top of each figure must be indicated. Pages that include color figures are subject to color charges.

*Tables.* All tables should appear inline in the submitted document file. Once a manuscript is accepted, each table should be submitted separately, typed double-spaced. Tables should be numbered with Roman numerals and should include a short title.

*References.* Authors must assume responsibility for the accuracy of the references used. Citations for the reference sections of submitted works should follow the standard form of "Index Medicus" and must be numbered consecutively. In the text, references should be cited by number. Examples: 1 Sumner AT: The nature of chromosome bands and their significance for cancer research. *Anticancer Res* 1: 205-216, 1981. 2 McGuire WL and Chamnes GC: Studies on the oestrogen receptor in breast cancer. In: *Receptors for Reproductive Hormones* (O' Malley BW, Chamnes GC (eds.). New York, Plenum Publ Corp., pp 113-136, 1973.

*Nomenclature and Abbreviations.* Nomenclature should follow that given in "Chemical Abstracts", "Index Medicus", "Merck Index", "IUPAC –IUB", "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", The CBE Manual for Authors, Editors and Publishers (6th edition, 1994), and MIAME Standard for Microarray Data. Human gene symbols may be obtained from the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) (<http://www.gene.ucl.ac.uk/>). Approved mouse nomenclature may be obtained from <http://www.informatics.jax.org/>. Standard abbreviations are preferable. If a new abbreviation is used, it must be defined on first usage.

*Clinical Trials.* Authors of manuscripts describing clinical trials should provide the appropriate clinical trial number in the correct format in the text.

For International Standard Randomised Controlled Trials (ISRCTN) Registry (a not-for-profit organization whose registry is administered by Current Controlled Trials Ltd.) the unique number must be provided in this format: ISRCTNXXXXXXXX (where XXXXXXXX represents the unique number, always prefixed by "ISRCTN"). Please note that there is no space between the prefix "ISRCTN" and the number. Example: ISRCTN47956475.

For Clinicaltrials.gov registered trials, the unique number must be provided in this format: NCTXXXXXXXX (where XXXXXXXX represents the unique number, always prefixed by 'NCT'). Please note that there is no space between the prefix 'NCT' and the number. Example: NCT00001789.

*Ethical Policies and Standards.* ANTICANCER RESEARCH agrees with and follows the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" established by the International Committee of Medical Journal Editors in 1978 and updated in October 2001 ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)). Microarray data analysis should comply with the "Minimum Information About Microarray Experiments (MIAME) standard". Specific guidelines are provided at the

"Microarray Gene Expression Data Society" (MGED) website. Presentation of genome sequences should follow the guidelines of the NHGRI Policy on Release of Human Genomic Sequence Data. Research involving human beings must adhere to the principles of the Declaration of Helsinki and Title 45, U.S. Code of Federal Regulations, Part 46, Protection of Human Subjects, effective December 13, 2001. Research involving animals must adhere to the Guiding Principles in the Care and Use of Animals approved by the Council of the American Physiological Society. The use of animals in biomedical research should be under the careful supervision of a person adequately trained in this field and the animals must be treated humanely at all times. Research involving the use of human foetuses, foetal tissue, embryos and embryonic cells should adhere to the U.S. Public Law 103-41, effective December 13, 2001.

*Submission of Manuscripts.* Please follow the Instructions for Authors regarding the format of your manuscript and references.

Manuscripts must be submitted **only** through our [online submission system](#).

In case a submission is incomplete, the corresponding Author will be notified accordingly.

Questions regarding difficulties in using the online submission system should be addressed to:  
email: [journals@iiar-anticancer.org](mailto:journals@iiar-anticancer.org)

*Galley Proofs.* Unless otherwise indicated, galley proofs will be sent to the corresponding Author of the submission. Corrections of galley proofs should be limited to typographical errors. Reprints, PDF files, and/or Open Access may be ordered after the acceptance of the paper. Authors of online open access articles published in 2015 are entitled to a complimentary online subscription to Anticancer Research 2015. Requests should be addressed to the Editorial Office. Galley proofs should be returned corrected to the Editorial Office by email within two days.

Copyright© 2015 - International Institute of Anticancer Research (J.G. Delinasios). All rights reserved (including those of translation into other languages). No part of this journal may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, microfilming, recording or otherwise, without written permission from the Publisher.

### **Specific information and additional instructions for Authors**

1. Anticancer Research (AR) closely follows the new developments in all fields of experimental and clinical cancer research by (a) inviting reviews on topics of immediate importance and substantial progress in the last three years, and (b) providing the highest priority for rapid publication to manuscripts presenting original results judged to be of exceptional value. Theoretical papers will only be considered and accepted if they bear a significant impact or formulate existing knowledge for the benefit of research progress.

2. Anticancer Research will consider the publication of conference proceedings and/or abstracts provided that the material submitted fulfils the quality requirements and instructions of the journal, following the regular review process by two suitable referees. (For further information please click [here](#))

3. An acknowledgement of receipt, including the article number, title and date of receipt is sent to the corresponding author of each manuscript upon receipt. If this receipt is not received within 20 days from submission, the author should call or write to the Editorial Office to ensure that the manuscript (or the receipt) was not lost in the mail or during electronic submission.

4. Each manuscript submitted to AR is sent for review in confidence to two suitable referees with the request to return the manuscript with their comments to the Editorial Office within 12 days from receipt. If reviewers need a longer time or wish to send the manuscript to

another expert, the manuscript may be returned to the Editorial Office with a delay. All manuscripts submitted to AR, are treated in confidence, without access to any person other than the Managing Editor, the journal's secretary, the reviewers and the printers.

5. All accepted manuscripts are peer-reviewed and carefully corrected in style and language, if necessary, to make presentation clear. (There is no fee for this service). Every effort is made (a) to maintain the personal style of the author's writing and (b) to avoid change of meaning. Authors will be requested to examine carefully manuscripts which have undergone language correction at the pre-proof or proof stage.

6. Authors should pay attention to the following points when writing an article for AR:

- The Instructions to Authors must be followed in every detail.
- The presentation of the experimental methods should be clear and complete in every detail facilitating reproducibility by other scientists.
- The presentation of results should be simple and straightforward in style. Results and discussion should not be combined into one section, unless the paper is short.
- Results given in figures should not be repeated in tables.
- Figures (graphs or photographs) should be prepared at a width of 8 or 17 cm with legible numbers and lettering.
- Photographs should be clear with high contrast, presenting the actual observation described in the legend and in the text. Each legend should provide a complete description, being self-explanatory, including technique of preparation, information about the specimen and magnification.
- Statistical analysis should be elaborated wherever it is necessary. Simplification of presentation by giving only numerical or % values should be avoided.

- Fidelity of the techniques and reproducibility of the results, should be points of particular importance in the discussion section. Authors are advised to check the correctness of their methods and results carefully before writing an article. Probable or dubious explanations should be avoided.
- Authors should not cite results submitted for publication in the reference section. Such results may be described briefly in the text with a note in parenthesis (submitted for publication by... authors, year).
- The References section should provide as complete a coverage of the literature as possible including all the relevant works published up to the time of submission.
- By following these instructions, Authors will facilitate a more rapid review and processing of their manuscripts and will provide the readers with concise and useful papers.

7. Following review and acceptance, a manuscript is examined in language and style, and galley proofs are rapidly prepared. Second proofs are not sent unless required.

8. Authors should correct their galley proofs very carefully and preferably twice. An additional correction by a colleague always proves to be useful. Particular attention should be paid to chemical formulas, mathematical equations, symbols, medical nomenclature etc. Any system of correction marks can be used in a clear manner, preferably with a red pen. Additions or clarifications are allowed provided that they improve the presentation but do not bring new results (no fee).

9. Articles submitted to AR may be rejected without review if:

- they do not fall within the journal's policy.
- they do not follow the instructions to authors.
- language is unclear.
- results are not sufficient to support a final conclusion.

- results are not objectively based on valid experiments.
- they repeat results already published by the same or other authors before the submission to AR.
- plagiarism is detected by plagiarism screening services.

(Rejection rate (2014): 65%).

10. Authors who wish to prepare a review should contact the Managing Editor of the journal in order to get confirmation of interest in the particular topic of the review. The expression of interest by the Managing Editor does not necessarily imply acceptance of the review by the journal.

11. Authors may inquire information about the status of their manuscript(s) by calling the Editorial Office at +30-22950-53389, Monday to Friday 9.00-16.00 (Athens time), or by sending an e-mail to [journals@iiar-anticancer.org](mailto:journals@iiar-anticancer.org)

12. Authors who wish to edit a special issue on a particular topic should contact the Managing Editor.

13. Authors, Editors and Publishers of books are welcome to submit their books for immediate review in AR. There is no fee for this service.

(This text is a combination of advice and suggestions contributed by Editors, Authors, Readers and the Managing Editor of AR).