

MARINA VAZ DE LIMA FULLIN SALDANHA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO p16 E SUA RELAÇÃO COM O
PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO**

BRASÍLIA

2012

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARINA VAZ DE LIMA FULLIN SALDANHA

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO p16 E SUA RELAÇÃO COM O
PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof^a Dr^a Eliete Neves da Silva Guerra

BRASÍLIA

2012

MARINA VAZ DE LIMA FULLIN SALDANHA

EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO p16 E SUA RELAÇÃO COM O
PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do Título de Mestre em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em
Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Eliete Neves da Silva Guerra - (presidente)

FS- UnB

Prof^a Dr^a Camila de Oliveira Rodini Pegoraro

FOB-USP

Prof^a Dr^a Fabiana Pirani Carneiro

FM- UnB

Prof^a Dr^a Nilce dos Santos Melo

FS- UnB

*Somente quando encontramos o amor, é que descobrimos o que nos faltava na vida.
Dedico este trabalho ao Douglas, que me completa em todos os sentidos!*

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao programa de pós-graduação da Faculdade de Ciências de Saúde da UNB.

À **Edigrês, Francisca** e todos os funcionários da Secretaria de Pós-Graduação.

Aos funcionários do arquivo médico do Hospital Universitário, pela ajuda nas consultas aos prontuários.

Às agências de fomento de pesquisa que possibilitaram a aquisição dos materiais utilizados em laboratório em todas as etapas deste trabalho.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Glorinha**, pelo cuidado com o preparo das lâminas deste trabalho, pelas conversas e pela alegria que preenche o Laboratório de Histopatologia.

A **Alexandre Palermo**, por toda sua dedicação e comprometimento com os trabalhos desenvolvidos no Laboratório.

A **Ana Elizia Mascarenhas**, companheira de jornada no Mestrado, pela amizade que surgiu entre nós.

A **Silvia Elias Taveira**, pela amizade e ensinamentos desde a época de estágio na Clínica de Estomatologia, e durante todo o curso.

A **Ana Luiza Laguardia** e **Lais Papini**, alunas da Iniciação Científica, pela ajuda na parte laboratorial. Especialmente a Ana Luiza, por ajudar a construir esse trabalho.

A **Dra. Leonora**, a quem tive o prazer de conhecer durante o Mestrado, por abrir as portas da Patologia, e pela disponibilidade e orientação nos trabalhos!

A **Prof. Eliete**, pelos incentivos constantes e vontade de ensinar. Ser professora e orientadora é um dom, e você o tem.

A Prof. **Camila Rodini**. Pela felicidade de ter você presente nesse momento tão importante! Nossa amizade ultrapassa a distância!

Aos meus pais, **Marta** e **Alceu**, pelo estímulo aos estudos, desde sempre!

A **José** e **Luiza**, muito mais que irmãos, amigos para toda uma vida!

A todos que acompanharam essa jornada de estudos, e de alguma forma contribuíram para que ela fosse possível.

RESUMO

O Papilomavírus Humano (HPV) está relacionado à patogênese de vários tipos de câncer, e uma associação causal entre o HPV e o câncer de cabeça e pescoço tem sido estabelecida recentemente. A infecção pelo HPV de alto risco está frequentemente associada à superexpressão da p16, uma proteína envolvida no controle do ciclo celular e utilizada como biomarcador para os eventos iniciais da carcinogênese. O objetivo deste estudo foi analisar a expressão da p16 em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e sua relação com o HPV. A amostra analisada foi composta por tecidos de biópsias emblocados em parafina de casos de carcinoma espinocelular de boca e orofaringe, e um grupo controle de hiperplasia fibrosa. Todos os casos foram avaliados para expressão de p16 pela técnica imunohistoquímica e para detecção do HPV pela reação de polimerização em cadeia (PCR). Nos casos de carcinoma, analisou-se a expressão de p16 na região do tumor e no epitélio adjacente, bem como no epitélio dos casos controle. Os dados clínicos e demográficos foram obtidos de arquivos médicos. 25% dos casos de câncer de boca e 35,7% de orofaringe foram positivos para p16. O epitélio adjacente mostrou 38,5% positividade para p16 em câncer de boca e 45,5% para orofaringe. O grupo controle apresentou positividade em 30% dos casos. Observou-se relação entre a morfologia queratinizante e a ausência de expressão de p16. A relação descrita na literatura entre superexpressão de p16 e presença de HPV não foi encontrada, pois nenhum caso foi HPV-positivo.

Palavras-chave: carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, p16, HPV, imunohistoquímica, nested PCR.

ABSTRACT

The Human Papillomavirus (HPV) has been linked to the pathogenesis of several types of cancer, and a causal association between HPV and head and neck cancer has been recently established. Proteins involved in cell cycle control are used as biomarkers to changes in the cycle and early events of carcinogenesis. The purpose of this study was to analyze the expression of the p16 protein in head and neck squamous cell carcinomas and its relationship with HPV. Paraffin-embedded biopsy tissues from patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) comprised the sample analyzed. A control group comprised biopsies diagnosed with fibrous hyperplasia. They were evaluated for p16 immunohistochemical expression in tumor tissue and adjacent epithelium and for the presence of HPV through DNA extraction and Nested PCR. Demographic data were obtained from medical records. Results: 25% of OSCC cases and 35.7% of OPSCC were positive for p16. The adjacent epithelium showed 61% of p16 OSCC positive and 45% in OPSCC. Control group presents positivity in 30% of cases. No patients presented HPV. The study showed that the low p16 expression in the tumor area indicates that this gene is inactivated in carcinogenesis. We did not find relationship between p16 and HPV, since no cases were HPV-positive.

Key Words: Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, p16, HPV, immunohistochemistry, nested PCR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	O locus CDKN2A (cromossomo 9p21) e o controle do ciclo celular	8
Figura 2	Esquema da malignização de queratinócitos induzida pelas oncoproteínas do HPV, E6 e E7	14
Figura 3	Morfologia dos carcinomas de cabeça e pescoço e expressão de p16	30
Figura 4	Morfologia dos carcinomas de cabeça e pescoço e expressão de p16	31
Figura 5	Expressão imuno-histoquímica do p16 em carcinoma de boca	32
Figura 6	Expressão imuno-histoquímica do p16 em carcinoma de orofaringe	33
Figura 7	Carcinoma espinocelular de boca e expressão do p16	34
Figura 8	Carcinoma espinocelular de orofaringe e expressão do p16	35
Figura 9	Padrões de expressão imuno-histoquímica do p16 nas áreas de invasão do carcinoma invasivo e epitélio adjacente.	37
Figura 10	Padrões de expressão imuno-histoquímica do p16 nas áreas de invasão do carcinoma invasivo e epitélio adjacente	38
Figura 11	Gel de PCR negativo para GP5+/6+ em casos de carcinoma de boca	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Reagentes utilizados para PCR	22
Tabela 2	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores	23
Tabela 3	Distribuição dos pacientes conforme variáveis clínicas analisadas	25
Tabela 4	Distribuição dos casos de carcinoma de boca, por sítios anatômicos	26
Tabela 5	Distribuição dos casos de carcinoma de orofaringe, por sítios anatômicos	27
Tabela 6	Estadiamento, de acordo com classificação TNM, para carcinoma de boca e orofaringe.	27
Tabela 7	Perfil Clínico-demográfico e associação com a presença da proteína p16	28
Tabela 8	Características histopatológicas e associação com a presença da proteína p16	29
Tabela 9	Expressão de p16 em carcinoma espinocelular de boca (região da lesão e epitélio adjacente), e grupo controle	32
Tabela 10	Expressão de p16 em carcinoma espinocelular de orofaringe (região da lesão e epitélio adjacente), e grupo controle	33
Tabela 11	Características histopatológicas e associação com a presença da proteína p16 para câncer de boca, orofaringe e grupo controle	36
Tabela 12	Dados dos pacientes – Grupo Controle	55
Tabela 13	Dados dos pacientes – Carcinoma Espinocelular de Boca	56
Tabela 14	Dados dos pacientes – Carcinoma Espinocelular de Orofaringe	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	por cento
µg	micrograma
µL	microlitro
Akt	do Inglês “serine–threonine kinase”
bp	pares de bases
CDK	complexo quinase dependente de ciclina
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	diaminobenzidina
DNA	do Inglês “desoxyribonucleic acid”
dNTP	do inglês “deoxyribonucleotideo triphosphate”
E1 e E2	do inglês “early E1” e “early E2”: proteínas regulatórias do genoma do HPV
E5, E6 e E7	oncoproteínas doHPV
EGFR	do Inglês “epidermal growth factor receptor”
<i>et al.</i>	e colaboradores
H ₂ O	água
HPV	Papilomavírus Humano
HUB	Hospital Universitário de Brasília
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INK4a	gene supressor de tumor
L1 e L2	do Inglês “late 1” e “late 2”: proteínas estruturais dos capsídeos do HPV

MgCl ₂	cloreto de magnésio
min	minuto
mTOR	do Inglês “mammalian target of rapamycin”
nm	nanômetro
nPCR	do Inglês “nested Polymerase chain reaction”
°C	graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	do Inglês “polymerase chain reaction”
PI3K	do Inglês “phosphoinositide 3-kinase”
pRb	proteína Retinoblastoma
PTEN	do Inglês “Phosphatase and tensin homolog protein”
R	ponto de restrição
RNA	do inglês “ribonucleic acid”
rpm	rotações por minuto
seg	segundos
Taq	DNA polimerase termoestável
TNM	estadiamento TNM, T=tumor, N=linfonodos, M=metástases a distância

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT	VII
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	VIII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	X
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO: EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO.....	3
2.2 p16 E ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR	5
2.3 PAPILOMAVÍRUS HUMANO E CARCINOGENESE	11
2.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE p16 E HPV	15
3 OBJETIVOS.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 PACIENTES	18
4.2 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO p16.....	18
4.3 EXTRAÇÃO DE DNA	20
4.4 REACAO DE POLIMERIZACAO EM CADEIA PARA DETECÇÃO DO HPV.....	21
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	23
4.6 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	23
5 RESULTADOS	24
5.1 DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS.....	24
5.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA	39
5.3 AVALIAÇÃO DO HPV	39
6 DISCUSSÃO.....	40
7 CONCLUSÃO	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo, com uma incidência anual estimada de um milhão de casos em todo o mundo (1, 2). Relatos de tendências crescentes desse tipo de câncer em alguns tipos de populações o torna cada vez mais objeto de estudo em pesquisas, que procuram aperfeiçoar métodos diagnósticos e relacionar fatores de risco ainda não bem estabelecidos, com o fim de reduzir a incidência e a mortalidade.

Os principais fatores de risco associados ao câncer de cabeça e pescoço são o fumo e o álcool (3,4,5), entretanto, alguns casos não possuem qualquer fator de risco identificável (6).

Após pesquisas evidenciarem a influência do HPV na carcinogênese do colo de útero (7) este vírus também começou a ser estudado como provável fator de risco do câncer em várias localizações anatômicas, sendo encontrada uma forte associação entre HPV dos tipos de alto risco e câncer de orofaringe (6,8,9) devido às suas semelhanças morfológicas com a região de colo de útero(10,11).

Apesar da variedade de achados nos índices de infecção por HPV em mucosa normal, lesões pré-malignas e carcinoma espinocelular, já há evidências, pelo menos quantitativamente, da relação entre o HPV e a carcinogênese em boca e orofaringe (9,12,13).

O HPV é um DNA vírus com tropismo pela célula epitelial e possui mais de 120 tipos isolados (14). Os HPVs oncogênicos, como os tipos 16 e 18, são associados aos carcinomas, sendo capazes de transformar células epiteliais dos tratos genital e respiratório (15,16). Essa transformação é resultado da função de duas oncoproteínas virais, E6 e E7, que funcionalmente inativam o p53 e pRb, proteínas importantes de genes supressores de tumores (9).

Os resultados da associação do HPV ao câncer de cabeça e pescoço ainda são controversos (8,17,18). Isso pode ser devido a variações na sensibilidade e especificidade dos métodos utilizados para detecção do vírus, a ausência de padronização e também a diversidade de técnicas laboratoriais para estudo do vírus (19,20,21).

Para investigação da presença do HPV em tumores humanos, os métodos de detecção devem ter alta sensibilidade e especificidade (16,20). Vários métodos bem

estabelecidos já existem, embora a detecção da expressão das oncoproteínas E6 e E7 seja o padrão ouro para a classificação de tumores como HPV-positivos. Alguns métodos de hibridização in situ têm apresentado resultados satisfatórios na detecção da infecção pelo HPV e da integração viral ao genoma do hospedeiro, confirmando a presença de atividade transcricional do vírus (21). Já os exames baseados em reação de polimerização em cadeia (PCR) têm sido frequentemente utilizados para detectar o DNA do HPV (22).

A expressão imuno-histoquímica do p16 têm sido utilizada como marcador substituto para a presença de HPV, sendo considerado um fator preditivo para a presença do vírus (23,24). Diversos trabalhos propõem a imuno-histoquímica como uma triagem inicial, seguida por detecção do HPV com exames mais específicos nos tumores p16 positivos (25,26,27).

A proteína p16 está relacionada ao controle do ciclo celular, inativando sua progressão por meio da inibição do complexo ciclina D/CDK4 e 6 (28). A mutação ou deleção do gene p16 pode afetar o balanço entre a proteína p16 e ciclina D, resultando em crescimento celular anormal (29). Carcinomas associados ao HPV são caracterizados por uma alteração na expressão do marcador p16, que pode ser detectável pela imuno-histoquímica.

Assim, este estudo pretendeu analisar a expressão do p16 em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e avaliar a possibilidade de utilização da imuno-histoquímica como um marcador confiável para a presença de HPV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA DE CABEÇA E PESCOÇO: EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO.

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é uma causa expressiva de morbidade e mortalidade, com uma estimativa de um milhão de casos novos em todo o mundo (1,2). Também conhecido como carcinoma epidermóide ou de células escamosas, compreende todos os tumores originários do epitélio muco-escamoso, desde o lábio, cavidades nasal e oral, faringe, até a laringe e ouvido médio (30).

Trata-se do sexto tipo de câncer mais comum, com relatos de aumento na incidência para cinco sítios anatômicos: cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe e laringe. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que, neste ano, ocorram aproximadamente 20.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço no Brasil, sendo 16.000 em homens e 4.000 em mulheres (31).

O perfil do paciente diagnosticado com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é homem de meia idade, fumante e de menor nível socioeconômico (31,32,33), sendo menos comum no mundo desenvolvido, exceto algumas partes da França (4), e mais comum no mundo em desenvolvimento, como Ásia e Brasil (1).

O tabagismo é um fator de risco para o câncer de cabeça e pescoço, mesmo para fumantes de pequenas quantidades e curta duração, enquanto o consumo de álcool possui efeito sinérgico, aumentando o risco de desenvolvimento de câncer em pacientes fumantes (3,33,34). O assoalho da boca é o sítio mais afetado pelos efeitos nocivos do tabaco e do álcool, enquanto as gengivas são menos suscetíveis (3). O risco associado ao consumo de tabaco e álcool não difere entre a cavidade oral e subsítios incluídos na orofaringe (palato mole, base da língua, pilar anterior). Estes resultados indicam que “check-ups” regulares devem ser orientados para os fumantes e etilistas, e que os esforços de prevenção devem ser focados em parar de fumar (34).

O hábito de fumar, incluindo o tabaco sem fumaça, e o consumo excessivo de álcool são relatados em até 80% dos casos com diagnóstico de carcinoma

espinocelular oral (3) e uma alta proporção de pacientes fumantes é descrita em estudos de câncer de cabeça e pescoço (33,34).

Apesar dos esforços bem-sucedidos para o controle do tabaco e consumo de álcool no mundo ocidental, vários países desenvolvidos denunciam o aumento de incidência em carcinoma espinocelular de orofaringe, especificamente em indivíduos jovens (35). Por isso, acredita-se que, além dos fatores etiológicos reconhecidos e amplamente estudados, outros agentes possam ajudar no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço (32,33,36).

No início dos anos 80, pesquisadores começaram a investigar se o HPV, a exemplo do que ocorre nos carcinomas de colo de útero e anogenitais, desempenharia algum papel no aparecimento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (11,37).

A infecção por HPV está relacionada a comportamentos sexuais e tem sido considerada um fator de risco para de câncer na cabeça e pescoço (38). Porém, apesar dos avanços tecnológicos nas últimas décadas, especialmente em biologia molecular, a interação entre o HPV e câncer de cabeça e pescoço ainda apresenta resultados inconsistentes (11,39,40,41).

2.2 p16 E ALTERAÇÕES NO CICLO CELULAR

2.2.1 Fases do ciclo celular

O ciclo celular é um processo organizado, e culmina na duplicação e transmissão de informação genética de uma célula-mãe para as filhas. Durante este processo o ácido desoxirribonucléico (DNA) precisa se replicar exatamente e distribuir cópias idênticas de cromossomos para as células resultantes da divisão celular (42).

Uma série de proteínas quinases é responsável pela estimulação e regulação do ciclo celular. Associadas às ciclinas, elas formam o complexo quinase dependente de ciclina (CDK). Esses complexos CDKs com suas ciclinas são fosforilados por uma quinase ativadora. A ciclina é a unidade regulatória e a CDK a unidade catalítica. Os complexos ciclina/CDK participam de diversos estágios do ciclo celular: realizam fosforilação de substratos de proteínas específicas para mover a célula no ciclo celular, ativam a síntese do DNA e formação de componentes associados com a mitose. A transição entre os estágios do ciclo celular é garantida pela periodicidade das ciclinas, por sua síntese e degradação proteolítica (28,43).

O ciclo celular é composto pelas seguintes fases: G1, M, S e G2. A fase G1 compreende o intervalo entre a mitose e a síntese. Durante G1 a célula está sujeita a estímulos mitogênicos extracelulares e fatores de crescimento. Na ausência de sinalização mitótica, a célula é submetida ao processo de diferenciação, apoptose ou passa para o estado de quiescência, chamado de G0 (44,45).

Em resposta aos estímulos mitóticos, uma cascata de reações de fosforilação e desfosforilação de proteínas se inicia, regulando a expressão das ciclinas. Por meio da via da proteína retinoblastoma (pRb), ocorre aumento da expressão de ciclinas D (45,46). As ciclinas D, associadas a CDK4 e CDK6 formam os complexos ciclinas D/CDK, que resultam em fosforilação e ativação das CDKs. As CDKs ativadas fosforilam a proteína retinoblastoma (pRb) (45).

A pRb exerce um papel crítico na regulação da progressão da fase G1 pelo ponto de restrição (R). No caso de dano genômico, o ciclo celular precisa ser

retardado ou abandonado (43,46). Caso não haja danos, a célula passa de G1 para S, onde inicia a síntese do DNA (44).

A fase G2 é o intervalo entre o término da síntese de DNA e a mitose. Durante a fase M ocorre a formação dos fusos mitóticos bipolares, separação de cromátides irmãs e divisão celular (42).

2.2.2 Regulação do ciclo

A regulação do ciclo celular deve assegurar que os eventos ocorridos em cada fase estejam completos e sem erros, antes de prosseguir. Por isso, os “*check points*” (pontos de checagem) que monitoram a integridade do DNA estão localizados ao final da fase G1 e na interface G2/M, prevenindo a progressão e propagação de células com mutações ou danificadas. (42,45).

Clones celulares defeituosos podem ser formados se houver erros durante a codificação genômica. Para que isso não ocorra existem sítios regulatórios que monitoram os eventos do ciclo celular. O sítio mais importante como ponto de checagem é o ponto de restrição, no final da fase G1. Quando um erro ocorre em estágios tardios do ciclo celular (fases S ou G2/M), outros pontos de checagem realizam este reconhecimento. Dependendo do grau do dano, o defeito pode ser reparado ou a mitose é abortada (21,42,44,45).

Os membros da família Rb, quando desfosforilados ou hipofosforilados, têm a função de se aderir ao fator de transcrição E2F e inibir a transcrição. Porém, quando ocorre a fosforilação da Rb pela CD4/6, há uma dissociação de Rb e E2F, com liberação da E2F para transcrever um número de genes de reação (incluindo ciclina E), necessários para a passagem pelo ponto de restrição (45). A pRb atua como “guardiã” da célula. Quando hipofosforilada, a pRb guarda o ponto de restrição, prevenindo a progressão do ciclo celular. A sua hiperfosforilação, por outro lado, é associada com a liberação de E2F, permitindo a passagem pelo ponto de checagem ao final da fase G1. O Rb mantém o seu estado de hiperfosforilação até o final da mitose, guiando a célula pelas fases S, G2 e M (42).

2.2.3 Atuação da p16

O gene CDKN2, também referido como INKA4, é um gene supressor de tumor, localizado no cromossomo humano 9p21. Este gene codifica uma proteína de 156 aminoácidos, designada p16, que se liga especificamente às quinases-dependentes de ciclina CDK4 e CDK6.

As quinases são os principais catalíticos para as ciclinas D, que colaboram com a ciclina E-CDK2 no controle da transcrição da fase G1 para S do ciclo celular (28,43,45,47).

No ciclo de divisão celular, a superexpressão do p16 inibe a progressão da fase G1 do ciclo celular, pela ligação ao complexo CD4/ciclina D, inibindo a fosforilação da pRb e retornando a formação do complexo pRb/E2F. Desse modo, ocorre o bloqueio da atividade quinase da enzima. Com isso, tem-se a finalização dos processos do ponto de checagem G1-S do ciclo celular (48), observado na Figura 1.

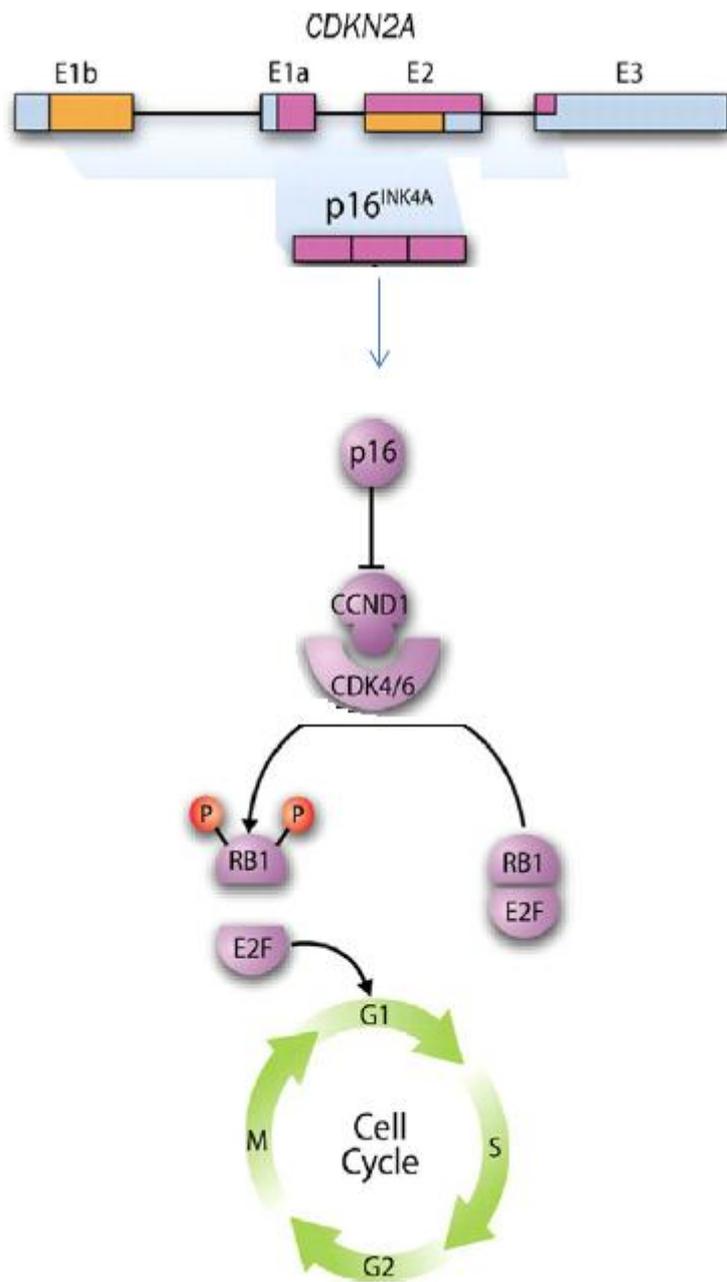


Figura 1. O *locus* CDKN2A (cromossomo 9p21) e o controle do ciclo celular. Uma das proteínas codificadas neste *locus* é o p16^{INK4A}. O produto desta proteína funciona como regulador negativo da progressão do ciclo celular, inibindo a ativação de CDK4 e CDK6 pela ciclina D1, impedindo assim a fosforilação de Rb1. A proteína Rb1 não-fosforilada sequestra o fator de transcrição E2F e impede-o de induzir a progressão da fase G1 para S no ciclo celular (adaptado de: Pérez-Sayánz *et al.*, 2011)

2.2.4 p16 em carcinoma de cabeça e pescoço

O processo de transformação maligna envolve numerosas mudanças que resultam na inativação de genes supressores de tumor e ativação de proto-oncogenes, levando à perda do controle do ciclo celular (21,46,47,48).

Desde que foi descoberta em 1993 (43,49), estudos vêm demonstrando que a expressão da proteína p16 está frequentemente alterada em neoplasias humanas como melanomas, leucemias, linfomas e carcinomas de colo de útero, esôfago e pulmão, assim como nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. Alterações no cromossomo e seu *locus* podem promover anormalidades no gene, assim como variações na expressão da proteína celular dos diversos tumores acima descritos (50,51).

Deleções ou mutações do gene supressor de tumores p16 têm sido demonstradas em carcinomas de cabeça e pescoço, indicando a importância do gene no desenvolvimento dessa neoplasia (29,46,45,48,50,52).

A ausência ou inativação da proteína p16 parece ser um evento precoce na carcinogênese, resultando em rompimento do controle do ciclo celular, com consequente desenvolvimento do tumor, o que está associado com tumores que mostram deficiência da p16 (27,45,51). Nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, Reed *et al.*(53) demonstraram que a inativação do gene da p16 está presente em 80% dos casos, sendo a deleção responsável por quase 50% deles.

A perda funcional do p16 resulta na proliferação celular anormal pela remoção da chave no ponto de checagem do ciclo celular, o que permite que as células progridam para a fase S, sem restrições. Uma relação recíproca tem sido vista entre expressão do p16 com a da pRb, sugerindo a presença de uma alça de controle de retroalimentação negativa que permite a pRb limitar a concentração de p16 (53,54). O gene INK4a alterado participaria do estágio inicial da transformação neoplásica em carcinomas espinocelulares, interferindo com a diferenciação terminal e levando a uma proliferação celular irrestrita (48,50).

Existem diferenças marcantes nas frequências da hipermetilação de genes e perda alélica entre carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (55). Esse fato sugere que o processo de carcinogênese pode ser diferente em tumores localizados

em várias partes da cabeça e do pescoço. A perda da função de genes supressores de tumor com a perda alélica dá origem a tumores na faringe e da laringe, enquanto que a perda de função, devido à metilação das regiões promotoras desses genes está relacionada com a carcinogênese na cavidade oral (47).

Além das diferenças encontradas entre a frequência de metilação da região promotora do gene supressor de tumor p16 em carcinomas de boca, de faringe e de laringe, tumores de pacientes do sexo feminino apresentaram frequência de metilação elevada em comparação com os tumores de pacientes do sexo masculino (55).

O p16 tem sido detectado em mucosas normais e displasias de grau leve. Em displasias de grau moderado a severo, a proteína foi detectada em poucos casos e em carcinoma espinocelular há rara ou nenhuma expressão (56). Diversos estudos corroboram esses resultados, indicando que o p16 se torna menos expresso a medida que aumentam as células envolvidas na atividade tumoral, e que há correlação significativa entre a menor expressão da proteína com estágio T mais avançado, comparado com carcinomas precoces (23,48).

Utilizando esse raciocínio, a expressão alterada de CDK4 e p16 pode fornecer evidências do potencial maligno de uma lesão (56), e a superexpressão de p16 pode ser considerada um marcador de prognóstico favorável, afetando o comportamento clínico desses tumores (25,26,57).

Além dos tumores malignos, a inativação do gene do p16 também tem sido frequentemente reportada em lesões bucais potencialmente malignas, sugerindo um papel precoce importante desse gene no desenvolvimento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (58,59). A inativação funcional da pRb pela oncoproteína E7 seria a responsável pela superexpressão da proteína p16 em lesões potencialmente malignas (46,58).

2.3 PAPILOMAVÍRUS HUMANO E CARCINOGENESE

2.3.1 Características do HPV

O HPV é um vírus circular, de dupla hélice de DNA e com aproximadamente 55 nanômetros de diâmetro. Pertence à família *Papillomaviridae*. O genoma viral, constituído por aproximadamente 8.000 pares de bases em tamanho, codifica duas proteínas regulatórias (dos genes “early” E1 e E2), 3 oncoproteínas (E5, E6 e E7) e duas proteínas estruturais de capsídeos (dos genes tardios L1 e L2). Seu material genético é envolto por uma cápsula proteica icosaédrica denominada capsídeo, que contém 72 capsômeros (10). Os HPVs são epiteliotróficos, capazes de infectar a pele e as mucosas em vários sítios corporais.

O ciclo de vida do HPV é complexo. Durante infecções iniciais, o DNA viral está presente como um episomo nuclear em um número pequeno de cópias na camada basal do epitélio estratificado. O DNA do HPV é amplificado e encapsulado na forma de partículas virais em células epiteliais terminalmente diferenciadas.

Dados recentes indicam que o estabelecimento da infecção inicial é firmemente correlacionado com a progressão do ciclo celular por meio da fase mitótica (16). A replicação do genoma do HPV requer a utilização da maquinaria da célula hospedeira para a síntese de DNA, e a codificação de proteínas pelo vírus mantêm as células epiteliais diferenciadas em estado de replicação competente (15).

Mais de 100 tipos de HPV são conhecidos, e podem ser divididos entre aqueles com predileção para infectar a pele e os com predileção por mucosas. Infecções por HPV na mucosa são bem conhecidas por estarem associadas com o espectro de doenças humanas desde papilomas benignos (ou verrugas) a carcinomas invasivos, incluindo os de colo de útero, vulvar, vaginal, anal, peniano e mais recentemente o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (60).

Um pequeno grupo de HPVs está associado à malignidade e relacionado a quase todos os tipos de carcinoma de colo de útero e um índice significativo de carcinoma de trato anogenital e oral, descritos como HPV de alto risco (6,61).

2.3.2 Associação do HPV com o câncer

O papel das oncoproteínas dos HPV's de alto risco (E5, E6 e E7) na transformação celular e manutenção do fenótipo maligno foi primeiramente descrito em cânceres de colo de útero (7). Pelo menos 15 tipos de HPV de alto risco foram identificados como base de associação com câncer (62). O HPV16 é o tipo mais comum, encontrado em 87 a 90% dos cânceres de orofaringe HPV positivos.

Embora alguns vírus já sejam causa estabelecida para diversos tipos de câncer (como o vírus Epstein-Barr para câncer de nasofaringe), uma associação causal entre HPV e câncer de cabeça e pescoço tem sido apresentada somente recentemente (16,63).

Tumores HPV negativos são associados geralmente com usuários pesados de tabaco e álcool, e tumores HPV positivos o são com comportamento sexual, o que é consistente com o meio predominantemente conhecido de transmissão de HPV (38).

A incidência de câncer com HPV relatado tem aumentado desde os anos 90 nos Estados Unidos e Europa Ocidental. Sugere-se que seja devido a hábitos sexuais, mas as razões para este rápido aumento ainda não são claras (6,12,34,64).

2.3.3 Malignização celular

Para que haja infecção pelo HPV, é necessário que ocorra a progressão da fase mitótica e a expressão do gene "early". Mais especificamente, o segmento "early" da prófase é a fase crítica para a infecção, determinado pela parada do ciclo celular na fase G2/M utilizando a ciclina quinase dependente CDK 1(45).

As oncoproteínas E6 e E7 do HPV tem papel primordial na transformação celular e manutenção do fenótipo maligno. A proteína E5 do HPV executa um papel importante durante o curso inicial da infecção ligando-se ao receptor para fator de crescimento epidermal (EGFR). Entretanto, a sequencia de codificação E5 é

frequentemente apagada do DNA viral episomal durante sua integração ao genoma do hospedeiro, logo E5 pode não ser necessário para estágios tardios da carcinogênese. O papel mais significativo para a carcinogênese e manutenção do fenótipo maligno é realizado por E6 e E7 (16).

A proteína E6 do HPV forma um complexo com uma ligase ubiquitina E3, a proteína associada E6 (E6AP) e ubiquitina a proteína supressora de tumor p53. A ubiquitinação causa rápida degradação do p53, o que resulta em desregulação dos checkpoints do ciclo celular G1/S e G2/M, danos ao DNA e outros importantes stress celulares levando à instabilidade genômica (16).

A proteína E7 se liga ao complexo ubiquitina ligase e ubiquitina a proteína supressora de tumores retinoblastoma (Rb). De novo, a ubiquitinação induz degradação da pRb resultando em descontrole da fase G1/S do ciclo celular. Na ausência da função pRb, os fatores de transcrição da família E2F são liberados e ocorre a transcrição dos genes da fase S, levando à proliferação celular (figura 2).

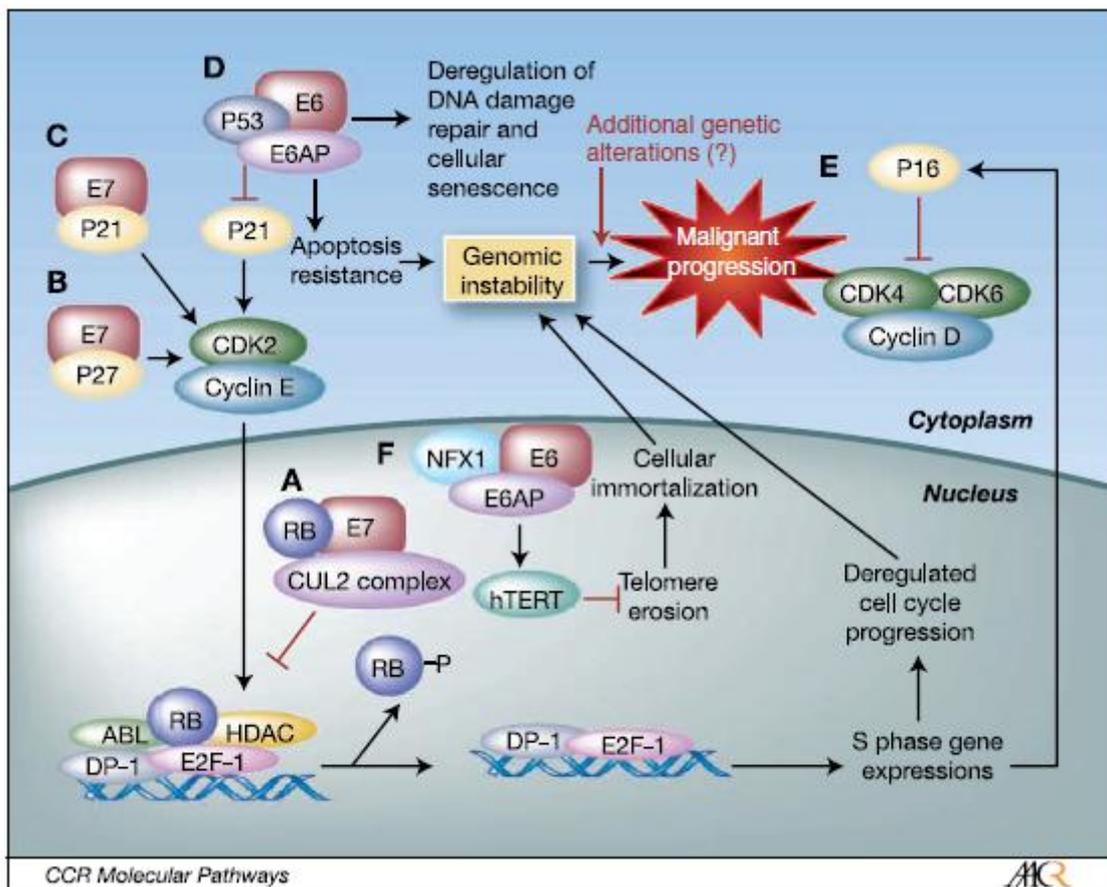


Figura 2. Esquema da malignização de queratinócitos induzida pelas oncoproteínas do HPV, E6 e E7. (Chung & Gillison, 2009)

2.3.4 Perfil do paciente com câncer HPV-positivo

O HPV é considerado um grave problema de saúde mundial, devido à sua associação com câncer anogenital e oral (61). Um grande número de pesquisas discute a conversão maligna de carcinomas de cabeça e pescoço relacionados ao HPV, os primeiros reportes datando de 1940 (65).

Embora o DNA genômico do HPV tenha sido detectado em câncer de cabeça e pescoço, seu papel etiológico no desenvolvimento desse tipo de câncer tem permanecido obscuro (9). Estudos recentes têm revelado um papel importante e intrigante para o HPV em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (66,67,68), e as análises genéticas apontam para uma classe completamente distinta de carcinoma (64,68,69,70).

Evidências estão se acumulando que carcinomas espinocelular de orofaringe que abrigam proteínas oncogênicas do HPV são biologicamente distintos e têm um melhor prognóstico (67,71,72). O conceito desse tipo de câncer "relacionado com o HPV" deve ser sustentado pela ideia que as células com transformação maligna abrigam HPV de alto risco e a expressão da proteína viral oncogênica apresenta efeitos sobre as vias de sinalização celular, promovendo a desregulação de componentes do ciclo celular.

A maioria dos estudos sugerem que pacientes com esse tipo de tumor tem um prognóstico melhor e alguns argumentam que uma abordagem terapêutica ajustada é necessária (8,16,69).

O perfil do paciente HPV-positivo difere do HPV-negativo em vários aspectos significativos, incluindo o teor molecular do tumor, história sexual do paciente, ausência de fatores de risco clássicos e prognóstico clínico (6,35,64,70,73).

Estudos recentes demonstram um importante papel para o HPV em carcinomas de cabeça e pescoço (41). Para zur Hausen (6), em uma estimativa conservadora, entre 25 a 30% dos cânceres de orofaringe possivelmente seriam causados por HPVs de alto risco pode estar próxima da realidade.

Acredita-se que o HPV associado ao carcinoma espinocelular de orofaringe é um subtipo de carcinoma de cabeça e pescoço com um perfil clínico e prognóstico distinto (70,71,74).

2.3.5 Epidemiologia do carcinoma de cabeça e pescoço HPV-positivo

Semelhante a cânceres anogenitais, uma proporção significativa de carcinomas de orofaringe é causada por infecção por HPV sexualmente adquirida e o aumento desse tipo de câncer tem sido atribuído a mudança de comportamento sexual no Mundo Ocidental (35,38).

Por outro lado, a infecção pelo HPV em lesões orais e carcinomas não-orofaringe são menos prevalentes do que se imaginava (17,39,75,76,77,78), sugerindo que o HPV pode não desempenhar um papel importante nas lesões orais, embora a sua presença não possa ser completamente excluída.

Relatórios sobre a prevalência do vírus do papiloma humano em carcinoma oral mostram resultados variados e a relação entre essas lesões e o HPV ainda permanece obscura (12).

2.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE p16 E HPV

Atualmente, não existe uma orientação geral sobre os biomarcadores mais adequados para a avaliação clínica de HPV em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço. Diversos marcadores prognósticos para HPV têm sido utilizados, como expressão de EGFR, p16, p53, PI3K, Akt, mTOR e PTEN (26,79).

A proteína p16 tem sido utilizada como um biomarcador para as células infectadas por de HPV de alto risco (15), e sua superexpressão associada a um marcador de triagem e substituto adequado para a presença do HPV (24,80).

Trabalhos relatam que a proteína pode estar superexpressa em um terço dos pacientes com diagnóstico de câncer de cabeça e pescoço, associada ao HPV (34). Estudos recentes de carcinoma da orofaringe relataram notável correlação entre a detecção do HPV integrado e superexpressão da proteína p16 nas células tumorais (74).

Estas descobertas levaram ao apelo para a substituição do teste de HPV pelo da expressão de p16 na prática clínica. A justificativa para tal prática é impulsionada pela simplicidade, baixo custo, bem como a viabilidade da análise imuno-histoquímica. Pesquisas revelam, contudo, alguns pontos a serem observados nesta análise: a natureza subjetiva da avaliação imuno-histoquímica, a variedade de formas de expressão de p16 em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, e a falta de critérios de interpretação (23).

Por outro lado, diversos autores não encontraram associação entre a superexpressão de p16 e a presença de HPV de alto risco (17,75,76) e não consideram o p16 um preditor confiável de positividade de HPV (57,81).

Para a classificação satisfatória na prática clínica, os autores sugerem que os testes para detecção de HPV deve ser trabalhados de forma confiável em células fixadas ou tecido fresco. Há evidências de que a detecção de HPV de alto risco utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) é insuficiente para classificar corretamente os tumores. Estudos sugerem que a detecção da superexpressão da proteína p16 por imuno-histoquímica pode ser usada como um marcador, que associado a testes específicos subsequentes, indicaria a infecção por HPV (19,23,24).

Um ponto crucial para a pesquisa de HPV em carcinoma de cabeça e pescoço tem sido muitas vezes negligenciado, que é a falta de um ensaio normalizado para a detecção de HPV (66,82). Isso resulta em uma variação considerável na frequência de tumores positivos para HPV entre os estudos relatados (11,25,34). Especialmente para testes baseados em PCR, por ser um teste muito sensível, pode haver a detecção do vírus sem implicar necessariamente em um envolvimento causal na carcinogênese. Por isso, muitos trabalhos sugerem uma associação de técnicas para refinar o diagnóstico (66).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é avaliar a expressão da proteína p16, que atua na via supressora de tumores, em lesões de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço dos pacientes do Hospital Universitário de Brasília, DF, e sua correlação com o Papilomavírus Humano.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a correlação da expressão imuno-histoquímica do p16 e a presença do Papilomavírus Humano em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.
2. Verificar a relação da expressão imuno-histoquímica do p16 com os achados clínicos e demográficos dos pacientes.
3. Identificar a prevalência do HPV no carcinoma de cavidade oral e orofaringe
4. Comparar a expressão do p16 na região do tumor, com a do epitélio adjacente e do grupo controle.
5. Avaliar a intensidade de expressão, as camadas celulares envolvidas e o perfil de distribuição da p16 entre os grupos estudados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PACIENTES

As amostras de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foram selecionadas dos arquivos do Centro de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da Universidade de Brasília (HUB). O material utilizado foi oriundo dos tecidos removidos por biópsias incisionais e excisionais, fixados em formol a 10% e emblocados em parafina. O critério de inclusão para o estudo foi a revisão histopatológica para confirmação diagnóstica do tumor. Foram constituídos três grupos de estudo: carcinoma espinocelular de boca, carcinoma espinocelular de orofaringe e hiperplasia fibrosa (grupo controle). As amostras foram analisadas por três patologistas, e classificadas conforme as seguintes características: padrão de diferenciação (bem, moderado ou pouco diferenciado), morfologia basalóide e morfologia queratinizante. A classificação obedeceu aos critérios propostos pela OMS para tumores em cavidade oral (5,30). O grupo controle foi constituído por amostras com perfil hiperplásico não inflamatório.

As variáveis clínicas e demográficas dos pacientes em estudo (idade do paciente no momento do diagnóstico, gênero, consumo de álcool e exposição ao cigarro) foram obtidas de arquivos médicos. A localização do tumor e seu estadiamento foram determinados em revisões de relatos operatórios, exames de imagem e histopatológicos. O estadiamento foi baseado na Classificação TNM – 6ª edição (31).

4.2 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO p16

A análise imunohistoquímica para expressão de p16 foi realizada em seções de 5µm de tecidos de biópsias, preparados por fixação em formalina e inseridos em parafina, utilizando o CINtec® Histology Kit (MTM laboratories AG, Heidelberg,

Germany). O CINtec® Histology Kit é baseado na utilização de um anticorpo monoclonal de rato (clone 6EH4) direcionado contra a proteína humana p16^{INK4a}.

As secções dos cortes foram montadas em lâminas silanizadas, permitindo uma melhor aderência do tecido. Antes da eliminação da parafina, as lâminas foram colocadas em um forno de secagem a uma temperatura de 60 °C durante 20 minutos para eliminar a água, aumentar a aderência do tecido ao cristal da lâmina e derreter a parafina. A seguir, as lâminas de tecido foram desparafinizadas em xilol para eliminar o meio de inclusão e reidratadas em cadeia descendente de etanol, sendo dois banhos em etanol absoluto, dois banhos em etanol 95% e um banho em etanol 79% (dois minutos para cada banho). Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos.

A seguir, foi realizado o tratamento de recuperação por calor do epítipo. O método de recuperação requer o aquecimento dos cortes de tecidos montados em lâminas, imersas em uma solução de recuperação do epítipo em um banho-maria a uma temperatura de 95 – 99 °C. Após, é aplicado o reagente de bloqueio da peroxidase durante 5 minutos. Em seguida, anticorpo primário ou reativo de controle negativo é aplicado também por 30 minutos. Por fim, aplica-se o reativo de visualização e o cromógeno (DAB) por 30 minutos cada. Foram utilizados controles negativo (omitindo o anticorpo primário) e positivo (carcinoma de colo de útero, conhecidamente positivo para p16). A descrição detalhada da técnica imuno-histoquímica utilizada encontra-se no Apêndice desta dissertação.

Para visualizar o resultado final, realizou-se a contra-coloração dos cortes em hematoxilina e a montagem das lâminas. A interpretação das lâminas coradas para p16^{INK4a} foi realizada juntamente com as lâminas coradas com hematoxilina e eosina, preparadas para a peça do mesmo tecido.

O padrão de expressão da proteína foi analisado na área do tumor e em epitélio adjacente, e classificado de acordo com sua intensidade e distribuição, conforme um escore elaborado (19,83), descrito da seguinte maneira: intensidade 0 (ausência de coloração), intensidade 1 nos casos em que houve coloração de menos de 10% das células; intensidade 2, de 10 até 30% das células, intensidade 3 de 30 a 70% das células, e intensidade 4, mais de 70% das células coradas. Foram consideradas tanto marcações nucleares quanto citoplasmáticas. A distribuição foi classificada em esparsa, focal ou uniforme. Foram analisadas também as camadas do epitélio onde houve predomínio da marcação do p16.

A intensidade de coloração, distribuição e camadas de células marcadas para p16 no tumor, em epitélio adjacente e no grupo controle foram avaliadas por uma junta de três patologistas e classificada de acordo com a escala descrita anteriormente.

As fotos dos cortes foram realizadas utilizando o microscópio Zeiss-Axio IMAGE, Vision LE.

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

Os fragmentos dos tecidos dos blocos de parafina foram cortados em micrótomo em secções de 12µm foram desparafinizados com xilol (1ml), misturados por vórtex e centrifugados a velocidade máxima (13.200 rpm) por 2 minutos à temperatura ambiente. A seguir, receberam banhos de etanol (96 a 100%) centrifugados por 2 minutos e tiveram todo o sobrenadante removido. Para a extração do DNA, foi utilizado o Kit da Qiagen - QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), seguindo as instruções dos fabricantes.

O pellet foi ressuspenso em tampão ATL (fornecido pelo fabricante) e misturado a proteinase K, sendo incubado a 56°C por uma hora e 90°C por mais uma hora. A incubação tem a função de reverter a modificação dos ácidos nucleicos pelo formaldeído. A seguir, o lisado passou por uma sequência de diluições em soluções tampão (AL, AW1, AW2, ATE), até a completa extração do material genético. A descrição detalhada da técnica para extração de DNA utilizada encontra-se no Apêndice desta dissertação.

As amostras obtidas foram armazenadas em tubos eppendorf e mantidas em refrigeração (-20°C) até a realização da quantificação. O DNA extraído foi diluído em 140µL de água destilada e quantificado por meio de leitura em um espectrofotômetro (UV-1601, Shimadzu Corporation, JP) a 260nm. A fórmula utilizada para o cálculo foi:

$$[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{Absorbância a } 260 \text{ nm} \times \text{fator de diluição} \times 50 \times 10^{-3}$$

4.4 REACAO DE POLIMERIZACAO EM CADEIA PARA DETECÇÃO DO HPV

A seguir, o DNA foi submetido à reação de polimerase em cadeia (Nested PCR) utilizando os primers PGMY09/11 e GP5+/6+, que abrangem ~450bp da região L1 da maioria dos tipos de HPV (12,84). Estes primers foram redesenhados a partir dos primers consenso MY09 e MY11 para aumentar a sensibilidade de amplificação de um espectro de tipos virais.

Tabela 1. Reagentes utilizados para PCR.

CICLO PGMY	CICLO GP5+/GP6+
5,0 µL de DNA	5,0 µL do produto do PCR anterior
7,2 µL PGMY 11/09 (cada primer)	2,5 µL de GP5+, 2,5 µL de GP6+
1,0 µL de MgCl ₂	3,0 µL de MgCl ₂
0,2 µL de dNTPs	1,0 µL de dNTPs
0,2 µL de Taq	0,3 µL de Taq
2,5 µL de Tp	2,5 µL de Tp
8,9 µL de H ₂ O	8,2 µL de H ₂ O

O volume final obtido para todas as amostras foi de 25 µl. Durante cada PCR executado todas as amostras foram testadas juntamente com um controle negativo (água). O conjunto de primers PGMY09/11 está descrito na tabela a seguir:

Tabela 2. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores

Iniciador*	Seqüência (5'-3')	Fragmento (pb)
PGMY11A	GCACAGGGACATAACAATGG	
PGMY11B	GCGCAGGGCCACAATAATGG	
PGMY11C	GCACAGGGACATAATAATGG	
PGMY11D	GCCCAGGGCCACAACAATGG	
PGMY11E	GCTCAGGGTTTAAACAATGG	450
PGMY09F	CGTCCCAAAGGAAACTGATC	
PGMY09G	CGACCTAAAGGAAACTGATC	
PGMY09H	CGTCCAAAAGGAAACTGATC	
PGMY09Ia	GCCAAGGGGAAACTGATC	
PGMY09J	CGTCCCAAAGGATACTGATC	
PGMY09K	CGTCCAAGGGGATACTGATC	
PGMY09L	CGACCTAAAGGGAATTGATC	
PGMY09M	CGACCTAGTGGAATTGATC	
PGMY09N	CGACCAAGGGGATATTGATC	
PGMY09Pa	GCCCAACGGAAACTGATC	
PGMY09Q	CGACCCAAGGGAAACTGGTC	
PGMY09R	CGTCCTAAAGGAAACTGGTC	
HMB01b	GCGACCCAATGCAAATTGGT	450
GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACYAC	
GP6+	GAAAAATAAAGTTGTAAATCATATTC	150

* Invitrogen Life Technologies®, Brasil.

A termociclagem consistiu na seguinte sequência: desnaturação inicial a 95 °C durante 2 min, seguido por 40 ciclos de 95 ° C durante 40 seg, 55 ° C durante 40 seg e 72 ° C durante 40 seg. O período de extensão final foi de 5 min a 72 ° C. Para os primers GP5 + / GP6 + a sequência empregada foi: desnaturação inicial a 94 ° C durante 4 min, seguido por 40 ciclos de 94 ° C durante 1 min, 40 ° C durante 1 min e 72 ° C durante 1 min, seguido por um período de extensão final de 7 min a 72 ° C (85). Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese num gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta (UV). Os controles negativos compreenderam um tubo com água em vez de DNA (22). Os

géis agarose foram examinados quanto à presença ou ausência de um fragmento amplificado de tamanho adequado, empregando uma classificação binária.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram estudados e comparados nos diferentes grupos de pacientes usando o teste do qui-quadrado de independência, após um consenso entre os três patologistas para uma categorização dicotômica dos tumores como positivo ou negativo para p16, graus de diferenciação e morfologia. A distribuição (média, frequência e percentagem) de variáveis relevantes disponíveis no estudo foram descritas para p16 (área do tumor e epitélio adjacente) e status do HPV. As diferenças foram testadas pelo teste Binomial Exato para proporções, com ajuste para a idade de diagnóstico, sexo, consumo de álcool, tabagismo e estadiamento do tumor. Todos os testes estatísticos foram efetuados com intervalos de confiança de 95%. O programa utilizado foi o SPSS versão 19.0.

4.6 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade de Brasília (Protocolo CEP/FS número 086/10), conforme ANEXO 1.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS

A amostra total compreendeu 20 casos de carcinoma espinocelular de boca e 14 de orofaringe. Os resultados encontrados mostram uma média de idade para diagnóstico do câncer de 54,2 anos. O gênero de maior incidência do carcinoma foi o masculino, correspondendo a aproximadamente 68% da amostra (23/34). Consumo de álcool foi relatado por 18/34 pacientes com câncer, e o hábito de fumar, por 24/34. O grupo controle exibiu apenas um paciente fumante e um etilista. Dados relativos ao gênero do paciente, hábito de fumar e etilismo foram considerados significantes quando comparados ao grupo controle, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Distribuição dos pacientes conforme variáveis clínicas analisadas, comparados ao grupo controle.

Característica	Câncer	Grupo Controle	p-valor
Gênero			
Masculino	23	3	
Feminino	11	7	0,0001*
Idade			
<50 anos	13	4	
≥50 anos	21	6	0,296
Fumante	23	1	0,0001*
Etilista	18	1	0,0001*

* Variável significativa a um nível de significância de 5% e intervalo de confiança de 95%.

Com relação à localização da lesão, dos 20 casos de carcinoma espinocelular de boca, 40,9% foram localizados em língua, 31,8% em assoalho de boca e 27,3% em gengiva. Língua e assoalho representaram a maioria das lesões encontradas, sendo que dois casos apresentavam lesão nos dois sítios. A tabela 4 mostra a

distribuição das lesões de boca estudadas, de acordo com a sub-localização anatômica, conforme Classificação de tumores malignos (31).

Tabela 4. Distribuição dos casos de carcinoma de boca, por sítios anatômicos.

Localização	n (%)
Mucosa oral	0 (0)
Gengiva	6 (27,3)
Palato duro	0 (0)
Língua	9 (40,9)
Assoalho de boca	7 (31,8)

Para avaliar a localização da lesão em orofaringe, adotou-se a Classificação de tumores malignos para sub-localização anatômica em orofaringe (31), conforme descrito:

1. Parede anterior (área glosso-epiglótica)
 - (i) Base da língua (posterior às papilas valadas ou terço posterior)
 - (ii) Valécula
2. Parede lateral
 - (i) Amígdala
 - (ii) Fossa amigdaliana e pilar amigdaliano
 - (iii) Prega glossopalatina (pilares amigdalianos)
3. Parede posterior
4. Parede superior
 - (i) Superfície inferior do palato mole
 - (ii) Úvula

Os casos de orofaringe tiveram como localização predominante a parede superior, que compreende a superfície inferior do palato mole e úvula (47% dos casos), seguido pela parede lateral (amígdala, fossa e pilares amigdalianos), com 35,3% dos casos, e parede anterior (base de língua), representando 17,7% dos casos, como pode ser observado na tabela 5.

Tabela 5. Distribuição dos casos de carcinoma de orofaringe, por sítios anatômicos.

Localização	n (%)
Parede anterior	3 (17,7)
Parede lateral	6 (35,3)
Parede posterior	0 (0)
Parede superior	8 (47)

Todos os casos em parede anterior foram localizados em base de língua. Dos casos de parede lateral, cinco tiveram localização em pilar amigdaliano e um em amígdala (tonsila). Todos os casos de parede superior foram localizados em palato mole.

O estadiamento de todos os casos de carcinoma de boca e orofaringe avaliados, indicado na tabela 6, mostrou que a maioria apresentava-se em um nível mais evoluído da doença (59% nos estágios III e IV).

Tabela 6. Estadiamento de acordo com classificação TNM, para carcinoma de boca e orofaringe.

Estadiamento	n (%)
I-II	2 (6)
III-IV	20 (59)
Desconhecido	12 (35)

5.2 PADRÕES HISTOPATOLÓGICOS

Os carcinomas de boca apresentaram-se bem diferenciados em 14 dos 20 pacientes avaliados. Já nos casos de orofaringe, os pacientes foram distribuídos quase igualmente entre as classificações pobre (cinco casos), moderadamente (cinco casos) e bem diferenciado (quatro casos).

Nenhum caso de carcinoma de boca apresentou morfologia basalóide, e apenas um caso de carcinoma de orofaringe exibiu esta característica. 22 dos 34 pacientes apresentaram morfologia queratinizante do tumor, sendo 14 em carcinomas de boca e 8 em carcinomas de orofaringe.

5.3 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO p16

Os carcinomas com marcação positiva para p16 tiveram relação significativa quando associados ao gênero do paciente, sendo predominantemente negativos em pacientes do gênero masculino (79% dos casos) e predominantemente positivos em pacientes do gênero feminino (60% dos casos). Não houve correlação estatística entre a marcação para o p16 e os achados clínicos para os fatores de risco estudados (alcoolismo e tabagismo). O estadiamento clínico dos carcinomas também não apresentou relação com a expressão do p16. Nenhum caso foi associado ao HPV, pois todas as amostras estudadas foram negativas para a presença do DNA viral. Os resultados detalhados podem ser observados na tabela 7, a seguir.

Tabela 7. Perfil clínico-demográfico e associação com a presença da proteína p16.

Características	Boca (20)		Orofaringe (14)		Todos (34)		p-valor
	p16-	p16 +	p16-	p16 +	p16-	p16 +	
Clínicas							
Idade do Diagnóstico							
Média	54,4	53	56,44	55,4	55,08	54,2	
<50 anos	5	2	0	1	5	3	
≥50 anos	10	3	9	4	19	7	0,566
Gênero							
Masculino	11	2	8	2	19	4	
Feminino	4	3	1	3	5	6	0,026*
Etilista	11	1	4	2	15	3	0,112
Fumante	11	1	4	2	15	3	0,315
Estágio do Tumor							
T1-T2	6	0	2	1	8	1	
T3-T4	4	2	5	2	9	4	
Tx	5	3	2	2	7	5	0,264
Linfonodos							
N0	0	0	0	2	0	2	
N1-N2	4	3	7	1	11	4	
N3	4	0	0	0	4	0	
Nx	7	2	2	2	9	4	0,132
Metástases							
M0	3	0	2	1	5	1	
M1	1	1	3	0	4	1	
Mx	11	4	4	4	15	8	0,606
Estadiamento							
I-II	1	0	0	1	1	1	
III-IV	9	2	7	2	16	4	
Unknown	5	3	2	2	7	5	0,345

O carcinoma espinocelular de orofaringe que apresentou morfologia basalóide não apresentou imuno-expressão para o p16 (figura 3). A morfologia queratinizante foi predominante nos carcinomas de boca (70% dos casos) e orofaringe (57% da amostra). O p16 apresentou superexpressão em quatro dos 14 casos com

morfologia queratinizante em carcinoma de boca (figura 4) e cinco dois oito casos com morfologia queratinizante em carcinoma de orofaringe. Os casos com ausência de expressão imuno-histoquímica para o p16 tiveram relação estatisticamente significativa quando associados à característica queratinizante do tumor. Os casos analisados que não apresentaram morfologia basalóide ou queratinizante foram excluídos da análise estatística dessas variáveis, e corresponderam a 11 pacientes da amostra. A tabela 8 explicita as características histopatológicas e sua relação com o p16.

Tabela 8. Características histopatológicas e associação com a presença da proteína p16.

Características Histopatológicas	Boca (n=20)		Orofaringe (n=14)		Todos (n=34)		p-valor
	p16-	p16 +	p16-	p16 +	p16-	p16 +	
Diferenciação							
Histológica							
Pobre	2	0	5	0	7	0	
Moderada	3	1	2	3	5	4	
Bem	10	4	2	2	12	6	0,133
Morfologia							
Basalóide	0	0	1	0	1	0	0,512
Morfologia							
Queratinizante	10	4	3	5	13	9	0,046*

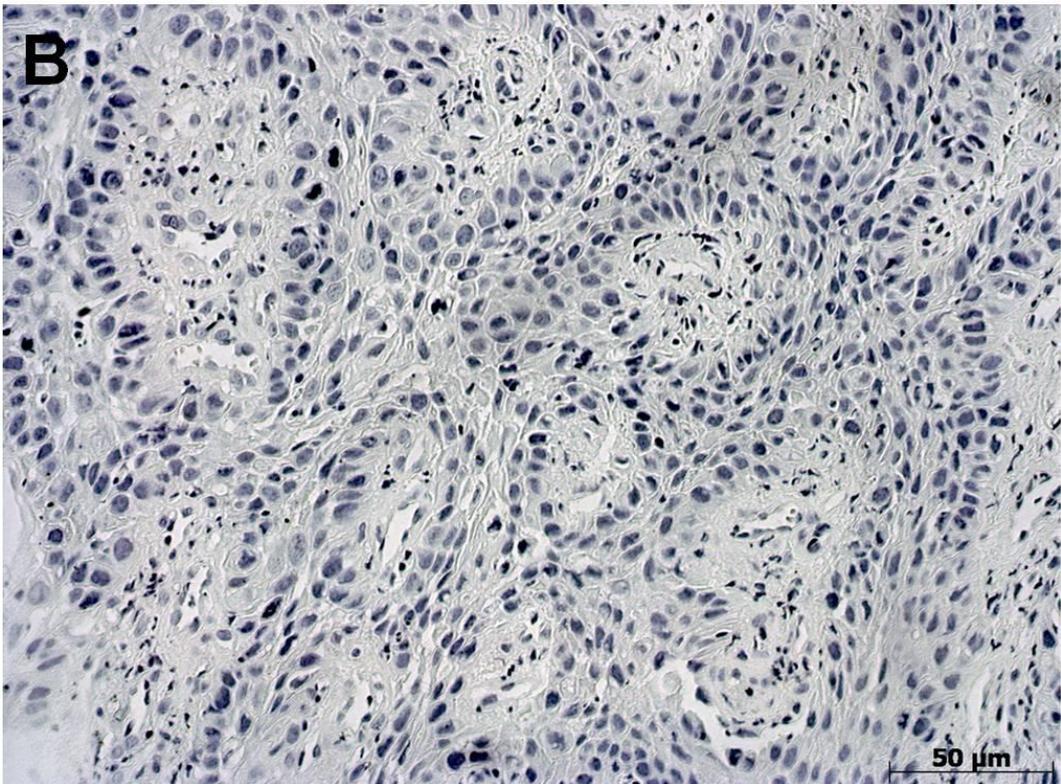
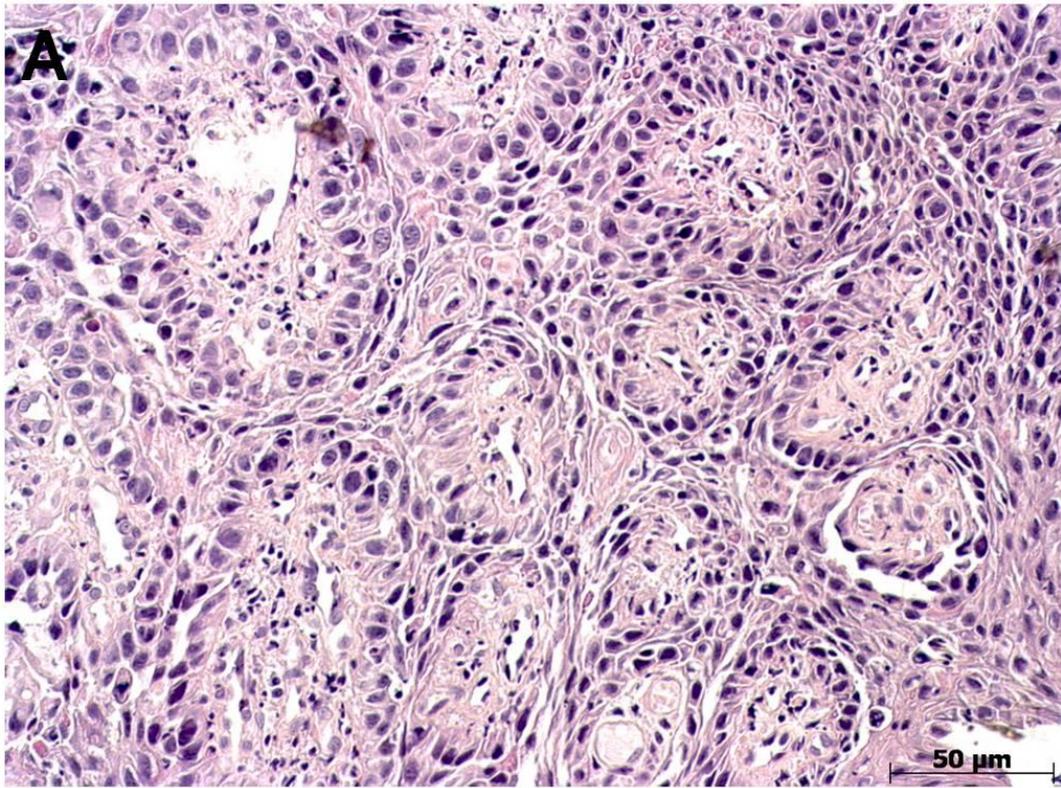


Figura 3. Morfologia dos carcinomas de cabeça e pescoço e expressão de p16.
(A) Palato mole - Carcinoma de orofaringe com característica basalóide HE 400x.
(B) Palato mole - Ausência de expressão imuno-histoquímica do p16 (p16, 400x).

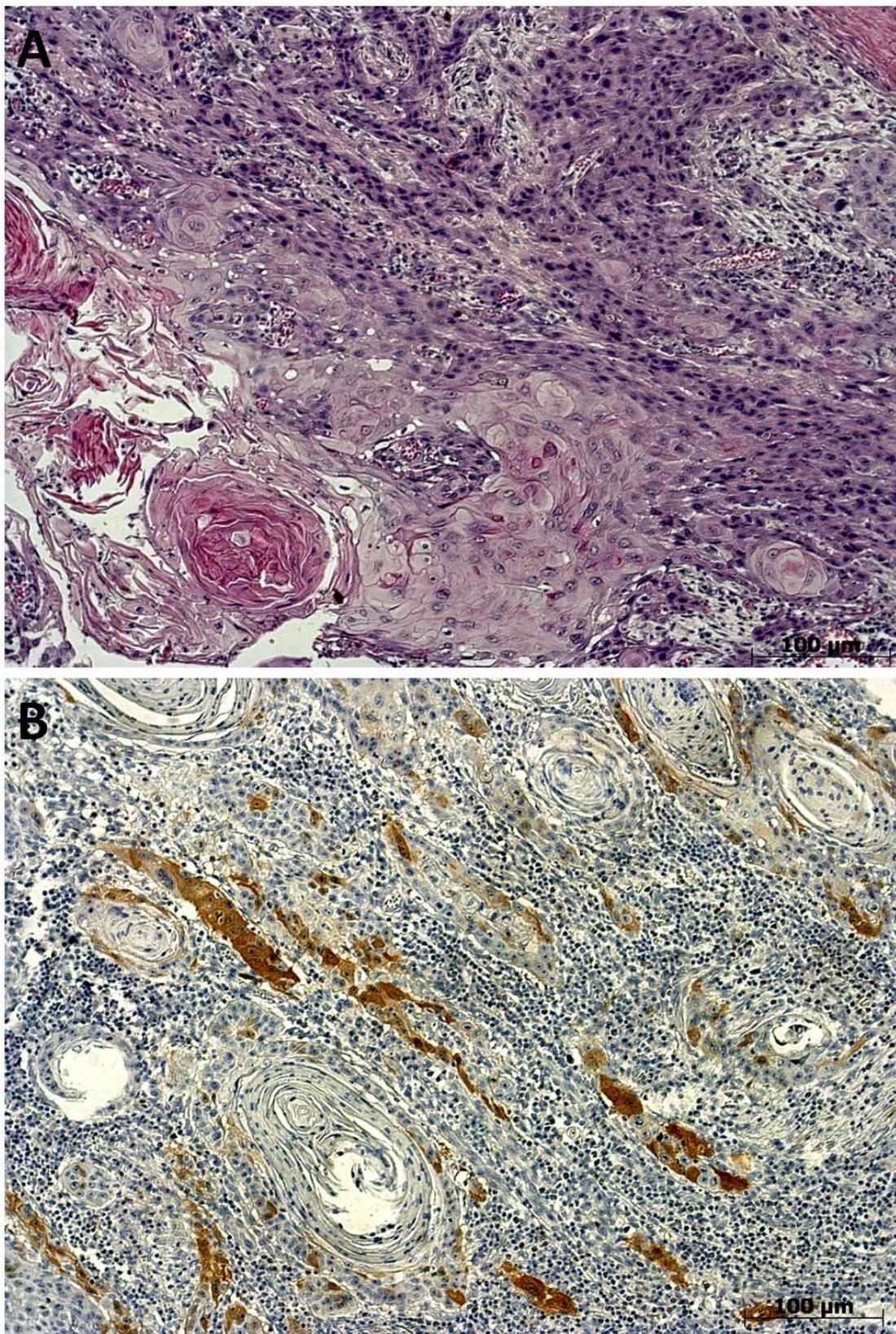


Figura 4. Morfologia dos carcinomas de cabeça e pescoço e expressão de p16. (A) Assoalho de boca - Aspecto queratinizante em carcinoma espinocelular com formação de pérolas córneas (HE, 200x). (B) Assoalho de boca - expressão imuno-histoquímica de p16 (p16, 200x).

A avaliação imuno-histoquímica de p16 foi positiva em 25% dos casos de carcinoma de boca (tabela 9). O grupo controle exibiu 30% de casos positivos, e o epitélio adjacente ao carcinoma, 38,5%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção de p16 positivo nos carcinomas de boca e a encontrada no grupo controle (p-valor=0,8084, [8,7%; 49,1%]). Também não foi encontrada diferença entre a região do epitélio adjacente e o grupo controle (p-valor= 0,5482, [13,8%; 68,4%]), bem como entre a região do carcinoma invasivo e o epitélio adjacente (p-valor=0,2565,[6,7%;65,2%]).

Tabela 9. Expressão de p16 em carcinoma espinocelular de boca (carcinoma invasivo e epitélio adjacente), e grupo controle.

Padrão Imuno-histoquímico	Carcinoma (%)	Epitélio Adjacente (%)	Grupo Controle (%)
Negativo	75	61,5	70
Positivo	25	38,5	30
Total	100	100	100

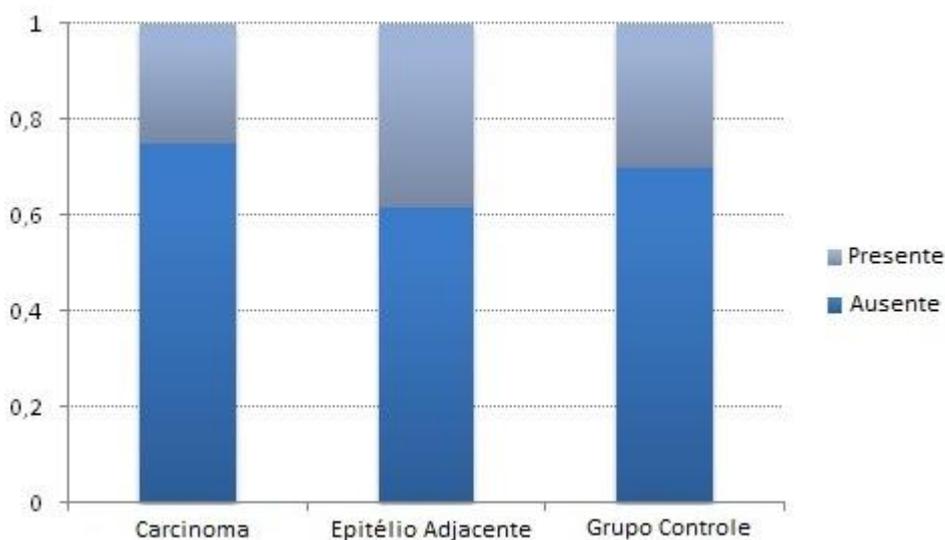


Figura 5. Expressão imuno-histoquímica do p16 em carcinoma de boca

Entre os casos de carcinoma de orofaringe, a avaliação imuno-histoquímica mostrou positividade para o p16 em 35,7% das amostras estudadas (figura 8). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção de p16 presente no grupo de carcinoma de orofaringe (região do carcinoma invasivo) e a encontrada no grupo controle (p-valor=0,771, [12,7%; 64,9%]). Também não foi encontrada diferença entre a região do epitélio adjacente e o grupo controle (p-valor= 0,2565, [6,7%; 65,2%]), bem como entre a região do tumor e o epitélio adjacente (p-valor= 0,595, [6,7%; 65,2%]).

Tabela 10. Expressão de p16 em carcinoma espinocelular de orofaringe (região do carcinoma invasivo e do epitélio adjacente), e grupo controle.

Padrão	Carcinoma	Epitélio Adjacente	Grupo Controle
Imuno-histoquímico	(%)	(%)	(%)
Ausente	64,3	54,5	70
Presente	35,7	45,5	30
Total	100	100	100

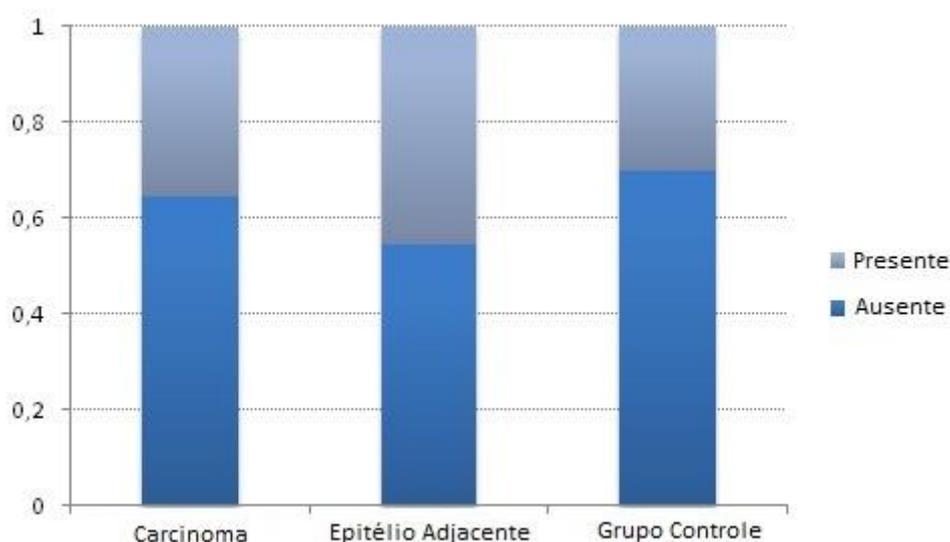


Figura 6. Expressão imuno-histoquímica do p16 em carcinoma de orofaringe

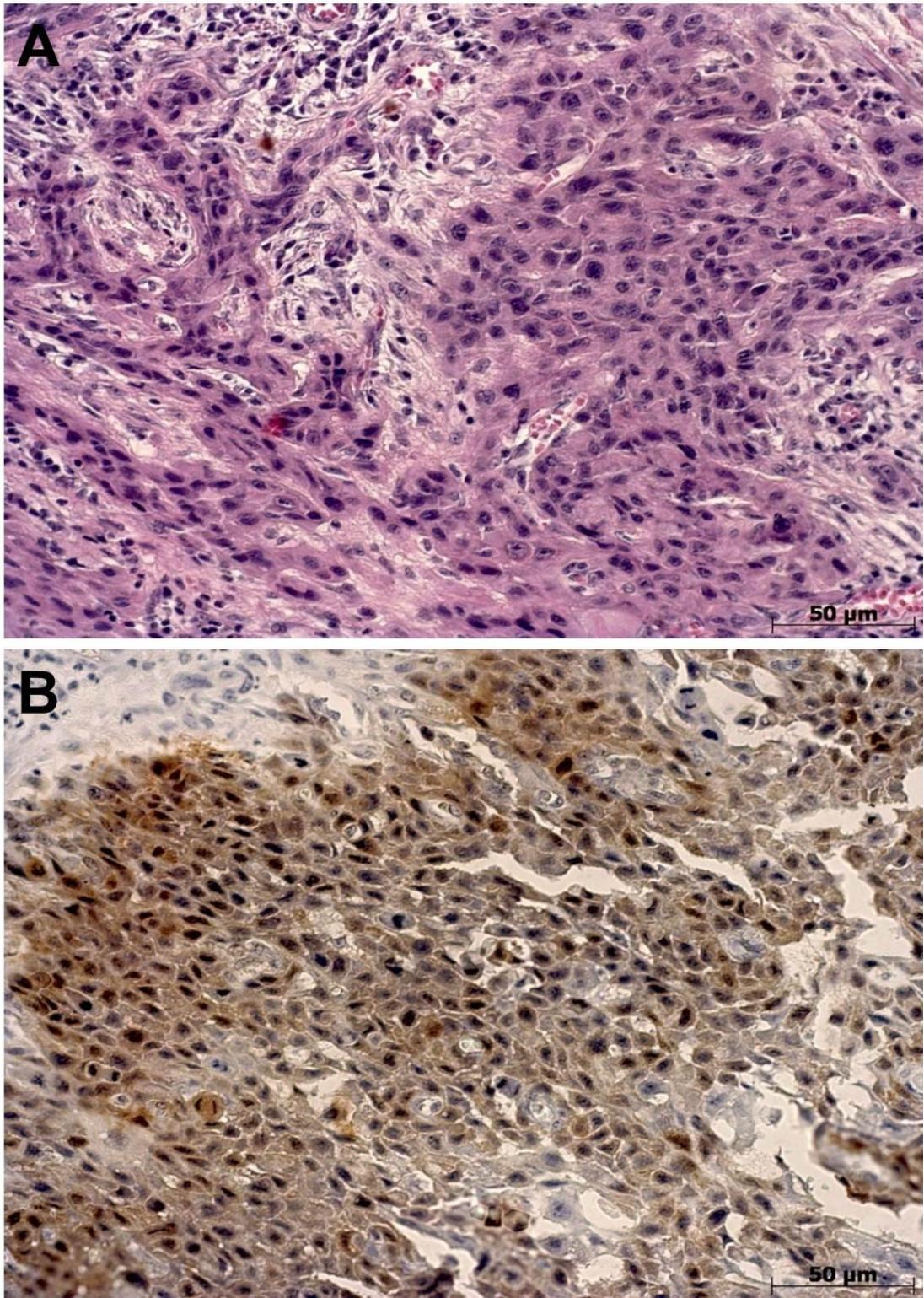


Figura 7. Carcinoma espinocelular de boca e expressão do p16. (A) Boca - Carcinoma espinocelular bem diferenciado de gengiva (HE, 400x). (B) Boca - Imunoexpressão da proteína p16, com distribuição uniforme na região do tumor (p16, 400x).

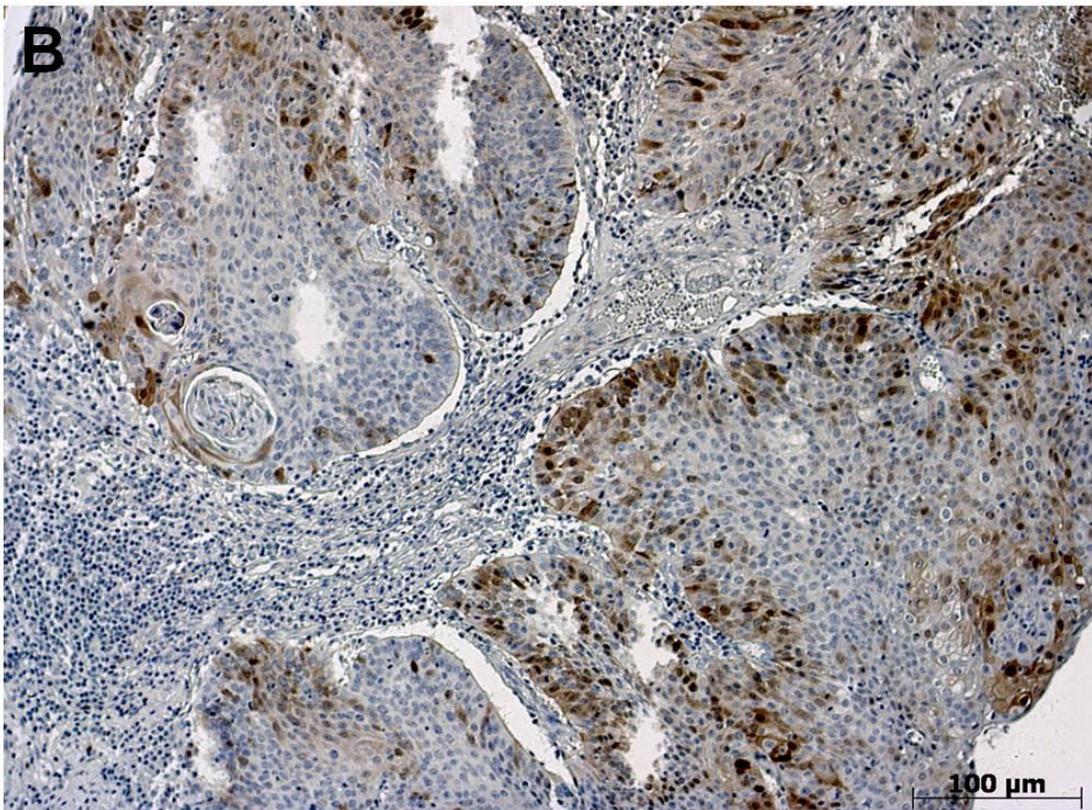
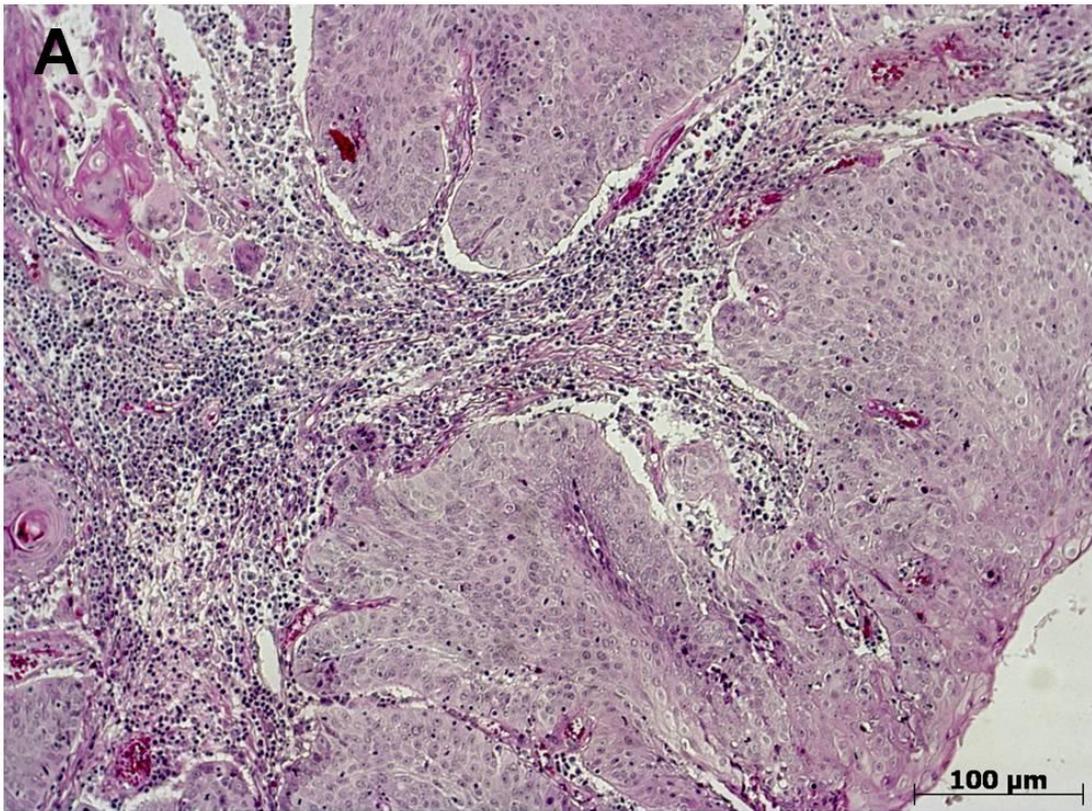


Figura 8. Carcinoma espinocelular de orofaringe e expressão do p16. (A) Parede lateral de orofaringe - Carcinoma espinocelular bem diferenciado (HE, 200x). (B) Parede lateral de orofaringe - Coloração imuno-histoquímica, evidenciando expressão do p16 com distribuição uniforme (p16, 200x).

O padrão de coloração imuno-histoquímica predominante em todas as amostras em região do carcinoma invasivo foi 1-2, que corresponde a uma marcação de até 30% em epitélio (3 de 5 casos em boca e orofaringe e 3 de 3 casos grupo controle). Apenas um caso de carcinoma de boca e um de orofaringe marcaram mais de 70% (padrão 4), e esta marcação se deu na região do carcinoma invasivo das duas amostras.

Para a região de epitélio adjacente, houve marcação em 5 de 13 casos em carcinoma de boca e 5 de 11 casos em orofaringe. Nem todos os casos estudados apresentaram epitélio adjacente para avaliação histológica, pois algumas biópsias eram incisionais, contendo apenas a área do carcinoma invasivo. Não houve diferença estatística entre a proporção de p16 encontrada no epitélio adjacente à região da lesão (38,5%) e o grupo controle (30%), p-valor=0,5482.

Tabela 11. Características histopatológicas e associação com a presença da proteína p16 para câncer de boca, câncer de orofaringe e grupo controle.

	Câncer Boca		Câncer Orofaringe		Grupo Controle
	Carcinoma	Epitélio Adjacente	Carcinoma	Epitélio Adjacente	
p 16					
Ausente	15	8	9	6	7
Presente	5	5	5	5	3
Não avaliado	0	7	0	4	0
Marcação					
0	15	5	9	6	7
1	1	5	2	2	2
2	2	3	1	2	1
3	1	0	1	1	0
4	1	0	1	0	0
Distribuição					
Esparsa	2	3	0	0	3
Focal	0	4	3	3	0
Uniforme	3	1	2	2	0

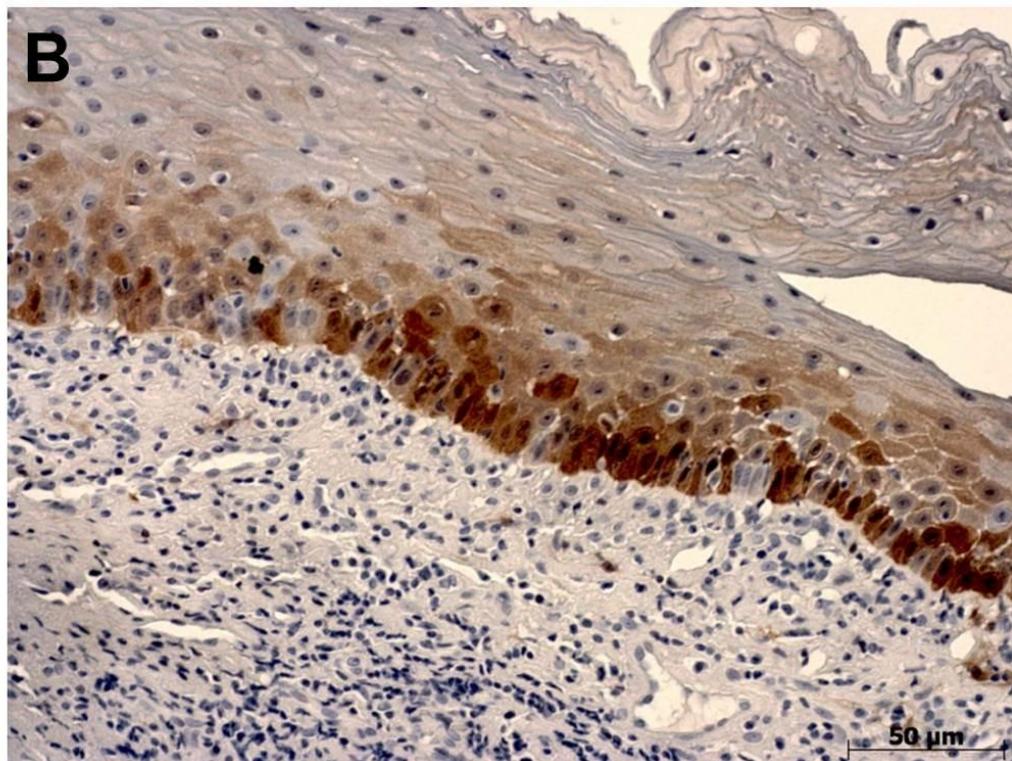
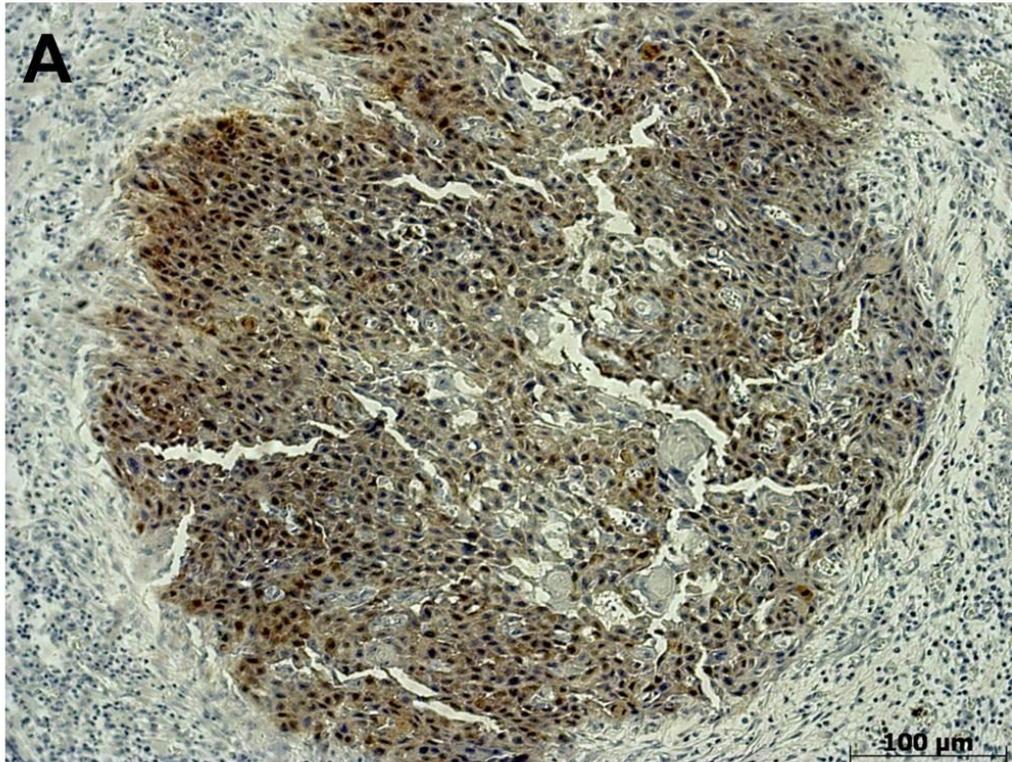


Figura 9. Padrões de expressão imuno-histoquímica do p16 nas áreas de invasão do carcinoma invasivo e epitélio adjacente. (A) Língua – Carcinoma de boca p16 positivo. (B) Língua – Região de epitélio adjacente à lesão com marcação de p16 nas camadas basal e suprabasal sendo a distribuição uniforme (p16, 200x em A, 400x em B)

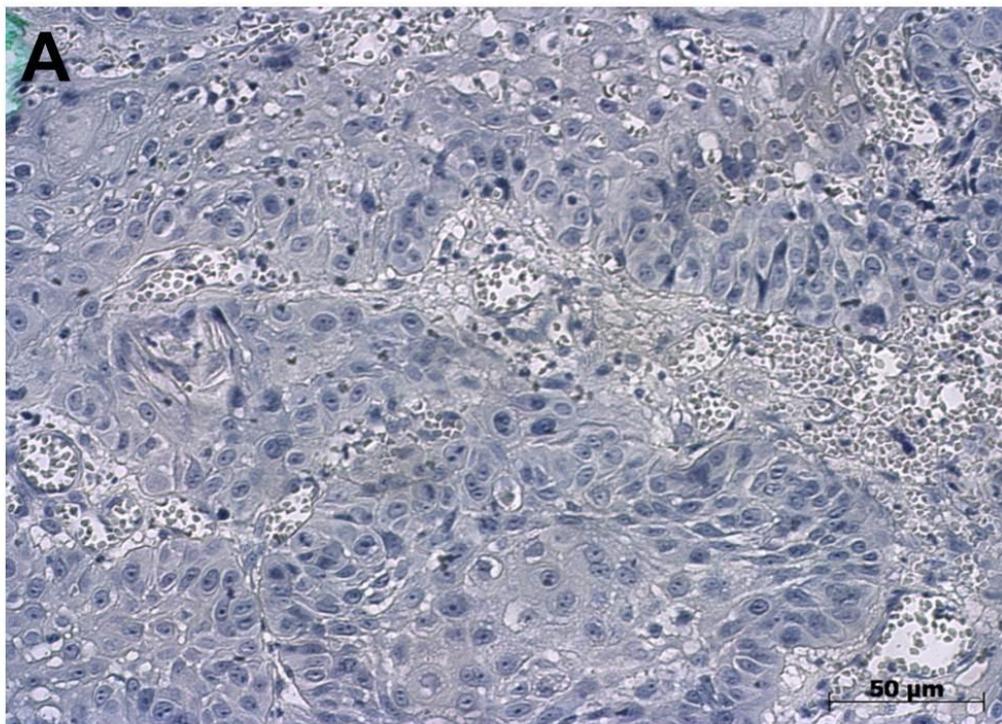


Figura 10. Padrões de expressão imuno-histoquímica do p16 nas áreas de invasão do carcinoma invasivo e epitélio adjacente. (A) Palato mole - Carcinoma de orofaringe com expressão negativa do p16. (B) Palato mole - Região do epitélio adjacente com expressão do p16 em até 10% das células, com padrão focal de distribuição e marcação citoplasmática.

A distribuição do p16 foi esparsa em todos os casos do grupo controle. Para os casos de carcinoma de boca, as áreas de carcinoma invasivo e epitélio adjacente exibiram distribuição esparsa (2 de 5 casos e 3 de 8 casos, respectivamente) ou uniforme na região do tumor (3 de 5 casos), e focal em epitélio adjacente (4 de 8 casos). Já nos carcinomas de orofaringe a distribuição ocorreu de forma focal (3 casos) e uniforme (2 casos), tanto na região do tumor quanto em epitélio adjacente.

As camadas basal e suprabasal exibiram maior marcação positiva para o p16 na região do epitélio adjacente (7/14 em boca e 5/11 em orofaringe).

5.2 QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Após a avaliação imunohistoquímica, foi realizada a extração de DNA de todos os casos. A quantidade de DNA encontrada variou de 0,005 a 1,1025 μ g/ μ L. O rendimento médio de DNA encontrado foi de 0,262 μ g/ μ L para todos os casos.

5.3 AVALIAÇÃO DO HPV

Avaliação por PCR utilizando os primers PGMY 09/11 e GP5+/GP6+ foi realizada em todas as amostras com DNA preservado. Em nenhum dos casos de carcinoma de boca e orofaringe foi detectada a presença do HPV. O grupo controle também foi negativo para HPV para todos os casos.

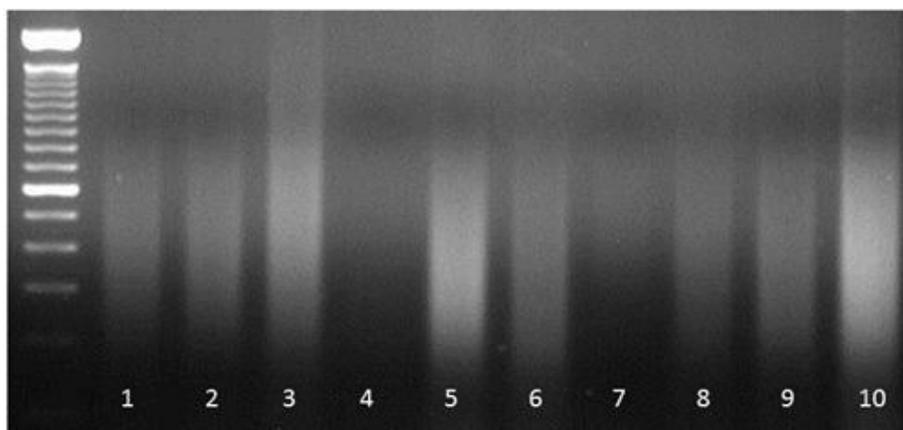


Figura 11. Gel de PCR negativo para GP5+/6+ em casos de carcinoma de boca.

6 DISCUSSÃO

6.1 IMUNO-EXPRESSÃO DO p16

A via p16^{INK4a} é reconhecida como um passo inicial na progressão do câncer (15,47). Além disso, o gene supressor de tumor p16 é considerado um marcador molecular para diagnóstico e prognóstico para carcinomas de cabeça e pescoço. Os resultados para expressão do p16^{INK4a} em carcinoma de boca e orofaringe apresentam resultados variados, mostrando tanto super quanto subexpressão (23,24,27,50,58,83,86).

Neste trabalho, a expressão do p16 observada nos casos de carcinoma foi sempre menor quando comparada com o grupo controle. Apesar da diferença observada, os resultados encontrados não apontam evidência estatística a um nível de significância de 5% entre a expressão de p16 em câncer de boca e orofaringe e o grupo controle. Em consulta à literatura, diversos trabalhos corroboram nosso resultado, mostrando a ausência deste gene supressor de tumor em câncer de cabeça e pescoço (87,88,89), o que pode indicar sua inativação nas etapas finais da carcinogênese.

Analisando as variáveis demográficas, observou-se que não houve diferenças entre os grupos p16 negativo e p16 positivo em relação à idade (maiores ou iguais a 50 anos e menores de 50 anos). No entanto, observamos que o p16 se apresentou mais expresso em pacientes do gênero feminino, o que evidenciou uma diferença estatisticamente significativa entre os casos p16 positivo, no que se refere a variável sexo.

Na avaliação das variáveis clínicas, verificamos que a maioria dos pacientes tabagistas e etilistas mostrou ausência na expressão de p16, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Também não foi encontrada associação entre o p16 e o grau de diferenciação histológico do tumor, o que ratifica alguns estudos (76).

Outro achado importante foi a relação entre a morfologia queratinizante e a ausência de expressão da proteína p16, resultado considerado significativo neste

trabalho. Muitos trabalhos evidenciam uma associação importante entre a morfologia basalóide, super expressão de p16 e presença de HPV em carcinomas de cabeça e pescoço (90,91). Dentre a amostra estudada, apenas um caso apresentou morfologia basalóide, o que poderia explicar o baixo número de casos com expressão positiva para p16. Thavaraj *et al.* (74) encontraram alta expressão de p16 nos carcinoma de tonsila, que apresentam morfologia predominantemente basalóide.

A região do epitélio adjacente às áreas tumorais apresentou maior expressão de p16 em comparação com a área do tumor, o que indica que o epitélio adjacente pode representar um marcador significativo para reconhecer a evolução de uma lesão maligna, e que a expressão das proteínas do ciclo celular neste epitélio podem representar marcadores importantes para reconhecer o início e a evolução do carcinoma (86).

Em relação à expressão de p16 na região de epitélio adjacente ao carcinoma invasivo, correspondendo às margens tumorais, a marcação para p16 foi observada em maior quantidade quando comparada ao grupo controle. As camadas celulares onde houve maior expressão da proteína foram as camadas basal e suprabasal. Esse fato pode estar relacionado a alterações celulares nestas regiões, que levariam à superexpressão desta proteína.

Já na região do tumor propriamente dita, a expressão do p16 foi sempre menor quando comparada ao epitélio adjacente, sendo mais expresso entre pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular em orofaringe, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as sub-localizações anatômicas.

6.2 p16 E A PRESENÇA DO HPV

Enquanto alguns trabalhos mostram resultados com associação positiva entre superexpressão de p16 e presença de HPV em casos de carcinoma de cabeça e pescoço, com especial ênfase aos localizados em orofaringe (9,74,58), outros mostram pouca ou nenhuma associação (75,83).

A relação descrita entre a superexpressão de p16 e a presença de HPV não foi encontrada neste trabalho, pois nenhum caso foi HPV-positivo. Assim como de Spindula-Filho *et al.* (17), concordamos que exista um viés de publicação, com a preponderância de resultados com achados positivos.

Alguns estudos levantam a hipótese que a superexpressão do p16 possa ser utilizada como um marcador para a infecção por HPV para casos de carcinoma, como o de tonsila (74,92,93), embora outros autores sugiram que a relação entre infecção pelo HPV e positividade para p16 são menores do que previamente descritas (17,75,94,95).

6.3 HPV E CARCINOGENESE EM CABEÇA E PESCOÇO

A prevalência de infecção por HPV em carcinoma de boca e orofaringe e seu papel na patogênese dessas lesões é tema de vários estudos que mostram resultados inconsistentes, com variações entre 0 a 100% (58).

Os resultados discrepantes podem ser explicados pelas características epidemiológicas dos pacientes estudados (39,96) e diferentes metodologias utilizadas, principalmente quanto à técnica de detecção do vírus (19,20,69,84,97). Outro fator que pode explicar a amplitude da prevalência do HPV é o tipo de material utilizado, pois trabalhos demonstram que a detecção do HPV em material fresco é maior quando comparada com material embocado em parafina (98).

A hipótese formulada para a pesquisa foi de que o HPV teria um papel na promoção dos tumores de cabeça e pescoço, com maior prevalência em carcinomas de orofaringe. No entanto, nenhuma correlação com HPV foi estabelecida em nosso trabalho, uma vez que todas as amostras foram negativas para o vírus. Com base nessa afirmação, podemos sugerir que o HPV não desempenharia um papel importante na carcinogênese das lesões bucais, embora a sua presença não possa ser completamente descartada (41,77).

6.4 HPV E VARIÁVEIS CLÍNICO-DEMOGRÁFICAS

Com relação à localização anatômica do tumor, a maioria dos casos de carcinoma de orofaringe deste estudo (64%) teve sua localização em palato mole e os sítios anatômicos de maior ocorrência das lesões em boca foram língua e assoalho (80%), resultados também encontrados por outros autores (95).

Em diversos relatos, a orofaringe é a localização com maior prevalência de HPV em carcinoma de cabeça e pescoço, sendo a tonsila, especificamente, o local mais acometido pelo vírus (35,74,9399,100).

Neste estudo apenas um paciente apresentou carcinoma de tonsila e essa poderia ser a explicação da ausência de resultados positivos para o vírus HPV em orofaringe. A maioria dos estudos tende a avaliar as paredes lateral e posterior de orofaringe, ao invés das paredes anterior (que compreende base de língua e valécula) e superior (palato mole), sendo o palato mole um subsítio ainda pouco estudado para carcinoma de orofaringe.

Além disso, o alto índice de paciente fumantes na amostra (70%) corrobora o fato de que este seja, ainda, o principal fator de risco para o câncer de boca e orofaringe. Ribeiro *et al.* (41) encontraram correlação entre pacientes fumantes e tumores HPV-negativos. Um possível mecanismo para explicar esta interação seria a atuação do cigarro em outras vias da carcinogênese, diferentes de p53 e pRb.

A baixa prevalência de HPV em estágio clínico avançado é relatada por alguns autores (8,20,40,101,102), que afirmam que tumores de estadiamento clínico III e IV são menos infectados pelo HPV. Os resultados obtidos por este trabalho concordam com esta casuística, pois a maioria dos pacientes (59%) possuía estadiamento clínico avançado (III e IV) e foram negativos para HPV.

6.5 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DO HPV

Para avaliar o HPV, utilizamos o Nested PCR, que é um método utilizado para detecção do HPV devido à sua alta sensibilidade (61,69), por utilizar 2 grupos de primers. O PGMY09/11 tem se mostrado um exame com bastante confiabilidade (84,85,97) quando utilizado para avaliar a presença de HPV em carcinomas de cabeça e pescoço.

Entretanto, alguns fatores podem contribuir para a falha na realização da PCR com DNA extraído de material parafinado, como a presença de substâncias inibidoras e principalmente a degradação do DNA (103), que pode ocorrer devido ao tempo entre a remoção cirúrgica do tecido e a fixação, ao tipo de fixação utilizada e tempo de armazenamento da amostra.

A combinação de 2 testes: inicialmente a coloração imuno-histoquímica para p16, seguida pelo PCR para detecção do DNA do HPV nas amostras p16 positivas é adotada por diversos trabalhos (23,24,58,69). Outro método que apresenta resultados satisfatórios na literatura é a hibridização in situ para detecção de E6 e E7 (104). Este trabalho adotou a combinação da imuno-histoquímica para p16 com a posterior extração de DNA do HPV, e embora alguns casos apresentassem superexpressão do p16, o HPV não foi detectado em nenhuma amostra.

7 CONCLUSÃO

1. Não houve relação entre a expressão de p16 e a presença do HPV, pois todos os casos estudados foram negativos para a presença do vírus.
2. A ausência de expressão do p16 teve relação com o gênero masculino e a morfologia queratinizante.
3. Não houve relação entre a presença de p16 e os fatores de risco estudados (álcool e cigarro).
4. O p16 teve baixa expressão em carcinoma de cabeça e pescoço, comparado ao grupo controle e epitélio adjacente, porém sem diferença estatística significativa.
5. O padrão de expressão de p16 foi semelhante para os casos de carcinoma espinocelular em boca e orofaringe.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sturgis EM. International head and neck cancer epidemiology consortium: Update no. 8. *Head Neck* (2012), doi: 10.1002/hed.23192.
2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45:309-16.
3. Radoï L, Paget-Bailly S, Cyr D, Papadopoulos A, Guida F, Schmaus A, Cénée S, Menvielle G, Carton M, Lapôtre-Ledoux B, Delafosse P, Stücker I, Luce D. Tobacco smoking, alcohol drinking and risk of oral cavity cancer by subsite: results of a French population-based case-control study, the ICARE study. *Eur J Cancer Prev*. 2012; 12: 20-34.
4. Katanoda K, Yako-Suketomo H. Cancer mortality attributable to tobacco by selected countries based on the WHO Global Report. *Jpn J Clin Oncol*. 2012 Sep;42(9):866.
5. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours, World Health Organization Classification of Tumours. IARC Press, Lyon, 2005.
6. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology*. 2009 Feb 20;384(2):260-5.
7. Meisels A, Morin C, Casas-Cordero M, Rabreau M. Human papillomavirus (HPV) venereal infections and gynecologic cancer. *Pathol Annu*. 1983;18 Pt 2:277-93.
8. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*. 2001 Aug 15;92(4):805-13.
9. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709-20.

* Referências organizadas conforme o estilo dos Requisitos Uniformes para Originais submetidos a Periódicos Biomédicos (Vancouver).

10. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002 May;2(5):342-50.
11. Lingen MW, Xiao W, Schmidt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, Perez-Ordóñez B, Jordan RC, Gillison ML. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2012.07.002>
12. Szarka K, Tar I, Fehér E, Gáll T, Kis A, Tóth ED, Boda R, Márton I, Gergely L. Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. *Oral Microbiol Immunol* 2009;4:314-8.
13. Acay R, Rezende N, Fontes A, Aburad A, Nunes F, Sousa S. Human papillomavirus as a risk factor in oral carcinogenesis: a study using in situ hybridization with signal amplification. *Oral Microbiol Immunol*. 2008 Aug;23(4):271-4.
14. zur Hausen H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol*. 1999 Dec;9(6):405-11.
15. McLaughlin-Drubin ME, Meyers J, Munger K. Cancer associated human papillomaviruses. *Current Opinion in Virology* 2012;2:459–466.
16. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2009 Nov 15;15(22):6758-62.
17. de Spíndula-Filho JV, da Cruz AD, Oton-Leite AF, Batista AC, Leles CR, de Cássia Gonçalves Alencar R, Saddi VA, Mendonça EF. Oral squamous cell carcinoma versus oral verrucous carcinoma: an approach to cellular proliferation and negative relation to human papillomavirus (HPV). *Tumour Biol* 2011;32:409-16.
18. Fujita S, Senba M, Kumatori A, Hayashi T, Ikeda T, Toriyama K. Human papillomavirus infection in oral verrucous carcinoma: genotyping analysis and inverse correlation with p53 expression. *Pathobiology*. 2008;75(4):257-64.
19. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, He X, Pickard R, Koluder M, Jiang B, Wakely P, Xiao W, Gillison ML. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol* 2012;36(7):945–54.

20. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Jones TM, Sheard J, Woolgar JA, Helliwell TR, Triantafyllou A, Robinson M, Sloan P, Harvey-Woodworth C, Sisson D, Shaw RJ. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res.* 2011 Oct 1;17(19):6262-71.
21. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Jul 7;96(13):998-1006.
22. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, Stisser K, Konig R, Tying SK. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods* 2004;122:87-93.
23. El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck.* 2012 Apr;34(4):459-61.
24. Thomas J, Primeaux T. Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? *Ann Diagn Pathol.* 2012 Apr;16(2):91-9.
25. Liang C, Marsit CJ, McClean MD, Nelson HH, Christensen BC, Haddad RI, Clark JR, Wein RO, Grillone GA, Houseman EA, Halec G, Waterboer T, Pawlita M, Krane JF, Kelsey KT. Biomarkers of HPV in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* 2012 Oct 1;72(19):5004-5013.
26. Lewis JS Jr. p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2012 Jul;6 Suppl 1:S75-82.
27. Pérez-Sayáns M, Suárez-Peñaranda JM, Gayoso-Diz P, Barros-Angueira F, Gándara-Rey JM, García-García A. p16INK4a/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough? *Cancer Letters* 2011, 306:134-141.
28. Coleman KG, Wautlet BS, Morrissey D, Mulheron J, Sedman SA, Brinkley P, Price S, Webster KR. Identification of CDK4 sequences involved in cyclin D1 and p16 binding. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18869-74.

29. Eshkour SA, Ismail P, Rahman SA, Mirinargesi M, Oshkour SA. Increased protein expression of p16 and cyclin D1 in squamous cell carcinoma tissues. *Biosci Trends*. 2009 Jun;3(3):105-9.
30. Thompson L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear Nose Throat J*. 2006 Feb;85(2):74.
31. Ministério da Saúde (Brasil), Instituto Nacional do Câncer. TNM: Classificação de Tumores Malignos. 6. Ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004.
32. Song F, Qureshi AA, Gao X, Li T, Han J. Smoking and risk of skin cancer: a prospective analysis and a meta-analysis. *Int J Epidemiol* (2012), doi: 10.1093/ije/dys146.
33. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis*. 2009 Sep;15(6):388-99.
34. Tribius S, Hoffmann AS, Bastrop S, Görögh T, Haag J, Röcken C, Clauditz T, Grob T, Wilczak W, Tennstedt P, Borchering A, Petersen C, Hoffmann M. HPV status in patients with head and neck of carcinoma of unknown primary site: HPV, tobacco smoking, and outcome. *Oral Oncol*. 2012 Nov;48(11):1178-84.
35. van Monsjou HS, Balm AJ, van den Brekel MM, Wreesmann VB. Oropharyngeal squamous cell carcinoma: a unique disease on the rise? *Oral Oncol*. 2010 Nov;46(11):780-5.
36. Rapidis AD, Gullane P, Langdon JD, Lefebvre JL, Scully C, Shah JP. Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):299-300.
37. Syrjänen KJ, Syrjänen SM, Lamberg MA, Pyrhönen S. Human papillomavirus (HPV) involvement in squamous cell lesions of the oral cavity. *Proc Finn Dent Soc*. 1983;79(1):1-8.
38. Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, Winn DM, Smith EM, Shan'gina O, Schwartz SM, Purdue MP, Pilarska A, Eluf-Neto J, Menezes A, McClean MD, Matos E, Koifman S, Kelsey KT, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wünsch-Filho V, Fernández L, Daudt AW, Curado MP, Chen C, Castellsagué X, Ferro G, Brennan P, Boffetta P, Hashibe M. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol*. 2010 Feb;39(1):166-81.

39. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol.* 2012 Jul;6 Suppl 1:S104-20.
40. Rades D, Seibold ND, Gebhard MP, Noack F, Schild SE, Thorns C. Prognostic factors (including HPV status) for irradiation of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Strahlenther Onkol.* 2011 Oct;187(10):626-32.
41. Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V, Curado MP, Shangina O, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Daudt A, Menezes A, Bencko V, Mates D, Fernandez L, Fabianova E, Gheit T, Tommasino M, Boffetta P, Brennan P, Waterboer T. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol* 2011;40:489-502
42. Israels ED, Israels LG. The cell cycle. *Oncologist.* 2000;5(6):510-3.
43. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature.* 1993 Dec 16;366(6456):704-7.
44. Gandarillas A. The mysterious human epidermal cell cycle, or an oncogene-induced differentiation checkpoint. *Cell Cycle.* 2012 Oct 31;11(24).
45. Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, Wong DT. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(1):51-61.
46. Chou J, Lin YC, Kim J, You L, Xu Z, He B, Jablons DM. Nasopharyngeal carcinoma--review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. *Head Neck.* 2008 Jul;30(7):946-63.
47. Romana PG. Cell alterations and molecular mechanisms in oral carcinogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg* (2010), doi:10.1016/j.ijom.2010.06.023.
48. Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2001 Mar 10;264(1):42-55.
49. Bressac-de Paillerets B. Discovery of a new gene frequently inactivated in human cancers: protein p16, a cell cycle regulator. *Bull Cancer.* 1994 Oct;81(10):853-6.
50. Ohta S, Uemura H, Matsui Y, Ishiguro H, Fujinami K, Kondo K, Miyamoto H, Yazawa T, Danenberg K, Danenberg PV, Tohnai I, Kubota Y. Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009 Jan;107(1):81-91.

51. Mortier L, Marchetti P, Delaporte E, Martin de Lassalle E, Thomas P, Piette F, Formstecher P, Polakowska R, Danzé PM. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16(INK4a) tumor suppressor. *Cancer Lett.* 2002 Feb 25;176(2):205-14.
52. Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol.* 2006 May;59(5):445-53.
53. Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology.* 2005;68(4-6):314-25.
54. Gulley ML, Nicholls JM, Schneider BG, Amin MB, Ro JY, Geradts J. Nasopharyngeal carcinomas frequently lack the p16/MTS1 tumor suppressor protein but consistently express the retinoblastoma gene product. *Am J Pathol.* 1998 Apr;152(4):865-9.
55. Shintani S, Nakahara Y, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. Inactivation of the p14(ARF), p15(INK4B) and p16(INK4A) genes is a frequent event in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2001 Sep;37(6):498-504.
56. Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T, Wong DT. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol.* 2002 Apr;38(3):235-43.
57. Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol.* 2002 Jan;55(1):58-60.
58. Montebugnoli L, Cervellati F, Cocchi R, Farnedi A, Pennesi MG, Flamminio F, Foschini MP. Immunohistochemical expression of p16(INK4A) protein as a helpful marker of a subset of potentially malignant oral epithelial lesions: study on a series with long-term follow-up. *Histopathology* 2010;57:528-34.
59. Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis.* 2007 Mar;13(2):126-33.
60. Erickson BK, Alvarez RD, Huh WK. Human papillomavirus: what every provider should know. *Am J Obstet Gynecol* (2012), doi: 10.1016/j.ajog.2012.09.007.

61. Seaman WT, Andrews E, Couch M, Kojic EM, Cu-Uvin S, Palefsky J, Deal AM, Webster-Cyriaque J. Detection and quantitation of HPV in genital and oral tissues and fluids by real time PCR. *Virology*. 2010 Aug 19;7:194.
62. Jayaprakash V, Reid M, Hatton E, Merzianu M, Rigual N, Marshall J, Gill S, Frustino J, Wilding G, Loree T, Popat S, Sullivan M. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncology*. 2011 Nov;47(11):1048-54.
63. Bahnassy AA, Zekri AR, Saleh M, Lotayef M, Moneir M, Shawki O. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated cervical carcinoma. *BMC Clinical Pathology*. 2007 May 24;7:4.
64. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology*. 2005 Mar;32 Suppl 1:S59-66.
65. zur Hausen H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1977;78:1-30.
66. Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2004 Jul;33(6):317-22.
67. Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *Journal of Dental Research*. 2009 Apr;88(4):300-6.
68. Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis*. 2011 Apr;17 Suppl 1:58-72.
69. Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Meijer CJ, Snijders PJ, Leemans CR. Human papilloma virus in head and neck cancer: the need for a standardised assay to assess the full clinical importance. *Eur J Cancer* 2009;45:2935-9.
70. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008 Mar 19;100(6):407-20.
71. Shiga K, Ogawa T, Katagiri K, Yoshida F, Tateda M, Matsuura K, Kobayashi T. Differences between oral cancer and cancers of the pharynx and larynx on a molecular level. *Oncology Letters* 2012;3:238-243.

72. Robinson M, Sloan P, Shaw R. Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing. *Oral Oncol.* 2010 Jul;46(7):492-6.
73. Zushi Y, Narisawa-Saito M, Noguchi K, Yoshimatsu Y, Yugawa T, Egawa N, Fujita M, Urade M, Kiyono T. An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. *Am J Cancer Res.* 2011;1:869-81.
74. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, Okpokam A, Sloan P, Odell E, Robinson M. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol.* 2011 Apr;64(4):308-12.
75. Ishibashi M, Kishino M, Sato S, Morii E, Ogawa Y, Aozasa K, Kogo M, Toyosawa S. The prevalence of human papillomavirus in oral premalignant lesions and squamous cell carcinoma in comparison to cervical lesions used as a positive control. *Int J Clin Oncol* 2011;16:646-53.
76. Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Márton IJ. Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006 Sep;102(3):344-52.
77. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Gavaldá C, Poveda R, Scully C, Alberola TM, Torres-Puente M, Pérez-Alonso M. Lack of association between proliferative verrucous leukoplakia and human papillomavirus infection. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Jan;65(1):46-9.
78. Popović B, Jekić B, Novaković I, Luković L, Konstantinović V, Babić M, Milasin J. Cancer genes alterations and HPV infection in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010 Sep;39(9):909-15.
79. Won HS, Jung CK, Chun SH, Kang JH, Kim YS, Sun DI, Kim MS. Difference in expression of EGFR, pAkt, and PTEN between oropharyngeal and oral cavity squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2012 Oct;48(10):985-90.
80. Park K, Cho KJ, Lee M, Yoon DH, Kim J, Kim SY, Nam SY, Choi SH, Roh JL, Han MW, Lee SW, Song SY, Back JH, Kim SB. p16 immunohistochemistry alone is a better prognosticator in tonsil cancer than human papillomavirus in situ hybridization with or without p16 immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol* (2012), doi:10.3109/00016489.2012.741327.

81. Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, Hayes DN, Couch ME, Kimple RJ. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck*. 2011 Nov;33(11):1622-7.
82. Pannone G, Rodolico V, Santoro A, Lo Muzio L, Franco R, Botti G, Aquino G, Pedicillo MC, Cagiano S, Campisi G, Rubini C, Papagerakis S, De Rosa G, Tornesello ML, Buonaguro FM, Staibano S, Bufo P. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infect Agent Cancer*. 2012 Feb 29;7:4.
83. Buajeeb W, Poomsawat S, Punyasingh J, Sanguansin S. Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med* 2009;38:104-8.
84. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, Voyer H, Franco E. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol*. 2002 Mar;40(3):902-7.
85. Winder DM, Ball SL, Vaughan K, Hanna N, Woo YL, Fränzer JT, Sterling JC, Stanley MA, Sudhoff H, Goon PK. Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers. *BMC Cancer* 2009, 9:440.
86. Angiero F, Berenzi A, Benetti A, Rossi E, Del Sordo R, Sidoni A, Stefani M, Dessy E. Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. *Anticancer Res* 2008;28:2535-9.
87. Prasad ML, Patel SG, Shah JP, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ. Prognostic significance of regulators of cell cycle and apoptosis, p16(INK4a), p53, and bcl-2 in primary mucosal melanomas of the head and neck. *Head Neck Pathol*. 2012 Jun;6(2):184-90.
88. Smith EM, Rubenstein LM, Hoffman H, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus, p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer. *Infect Agent Cancer*. 2010 Feb 11;5:4.
89. Hong A, Jones D, Chatfield M, Soon Lee C, Zhang M, Clark J, Elliott M, Harnett G, Milross C, Rose B. HPV status of oropharyngeal cancer by combination HPV DNA/p16 testing: biological relevance of discordant results. *Ann Surg Oncol* (2012), doi:10.1254/s10434-012-2778-4.
90. Maxwell JH, Kumar B, Feng FY, McHugh JB, Cordell KG, Eisbruch A, Worden FP, Wolf GT, Prince ME, Moyer JS, Teknos TN, Chepeha DB, Stoerker J, Walline H,

Carey TE, Bradford CR. HPV-positive/p16-positive/EBV-negative nasopharyngeal carcinoma in white North Americans. *Head Neck*. 2010 May;32(5):562-7.

91. Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis JS Jr. HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head Neck Pathol*. 2009 Sep;3(3):186-94.

92. Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, Henry H, Pfannenschmidt S, Burkhardt C, Görögh T, Halec G, Hoffmann AS, Kahn T, Röcken C, Haag J, Waterboer T, Schmitt M. HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer Lett*. 2012 Oct 1;323(1):88-96.

93. Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR, Lee MJ, Kim JM, Choi EC, Cho NH. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer*. 2007 Apr 1;120(7):1418-25.

94. Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Orchard G, Odell E, Thavaraj S. Human papillomavirus detection in dysplastic and malignant oral verrucous lesions. *J Clin Pathol*. 2012 Mar;65(3):283-6.

95. Simonato LE, Garcia JF, Sundefeld ML, Mattar NJ, Veronese LA, Miyahara GI. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. *J Oral Pathol Med*. 2008 Nov;37(10):593-8.

96. de Oliveira MG, Ramalho LM, Gaião L, Pozza DH, de Mello RA. Retinoblastoma and p53 protein expression in pre-malignant oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Mol Med Report*. 2012 Jul;6(1):163-6.

97. Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Nuovo GJ, Li M, Dunne A, Kawachi N, Smith RV, Burk RD, Prystowsky MB. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod Pathol*. 2011 Oct;24(10):1295-305.

98. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*. 2007 Dec 1;121(11):2465-72.

99. Luginbuhl A, Sanders M, Spiro JD. Prevalence, morphology, and prognosis of human papillomavirus in tonsillar cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2009 Oct;118(10):742-9.
100. Winder DM, Ball SL, Vaughan K, Hanna N, Woo YL, Fränzer JT, Sterling JC, Stanley MA, Sudhoff H, Goon PK. Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers. *BMC Cancer*. 2009 Dec 15;9:440.
101. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer*. 2000 May 20;89(3):300-4.
102. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, Mick R, Montag A, Graves D, Vokes EE, Weichselbaum RR. Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res*. 1996 Apr;2(4):755-62.
103. Steinau M, Patel SS, Unger ER. Efficient DNA extraction for HPV genotyping in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*. 2011 Jul;13(4):377-81.
104. Bishop JA, Ma XJ, Wang H, Luo Y, Illei PB, Begum S, Taube JM, Koch WM, Westra WH. Detection of Transcriptionally Active High-risk HPV in Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma as Visualized by a Novel E6/E7 mRNA In Situ Hybridization Method. *Am J Surg Pathol*. 2012 Dec;36(12):1874-82.

APÊNDICE 1 - DADOS DOS PACIENTES AVALIADOS

Tabela 12. Dados dos pacientes - Grupo Controle

Paciente	Gênero	Fumante	Etilista	Localização	Avaliação p16				PCR HPV	Quantificação DNA
					Presença	Intensidade	Distribuição	Células		
1	Fem	N.A.	+	Palato	+	3	Esparsa	B, Sb	-	0,1075
2	Masc	N.A.	N.A.	Gengiva	-	-	-	-	-	0,0075
3	Fem	N.A.	N.A.	Gengiva	-	-	-	-	-	0,2275
4	Fem	-	-	Gengiva	-	-	-	-	-	0,3625
5	Fem	N.A.	N.A.	Assoalho	+	2	Esparsa	B	-	0,5125
6	Masc	N.A.	N.A.	Mucosa	+	2	Esparsa	B	-	0,1275
7	Fem	N.A.	N.A.	Gengiva	-	-	-	-	-	0,095
8	Fem	N.A.	N.A.	Gengiva	-	-	-	-	-	0,1375
9	Masc	N.A.	N.A.	Mucosa	-	-	-	-	-	0,215
10	Fem	+	-	Gengiva	-	-	-	-	-	0,1075

N.A.: dado não avaliado (ausência de informações no prontuário)

Intensidade: 1 (até 10%), 2 (10-30%), 3 (30-70%), 4 (mais de 70%)

Células: B (Basal), Sb (Supra-basal), Sf (Superficial)

Tabela 13. Dados dos pacientes – Carcinoma Espinocelular de Boca

Paciente	Gênero	Idade Diagnóstico	Fumante	Etilista	Localização*	T	N	M	Estágio do Tumor	PCR HPV	Quantificação DNA
1	Fem	67	+	+	Gengiva	3	2	X	IVA	–	0,195
2	Masc	68	+	+	Língua	4	3	X	IVB	–	0,1775
3	Masc	50	+	+	Língua	3	X	X	III	–	0,25
4	Masc	48	N.A.	+	Língua	4	2b	0	IVA	–	0,1975
5	Fem	56	+	–	Gengiva	3	2	0	IVA	–	0,005
6	Fem	54	N.A.	N.A.	Língua	1	1	1	IVC	–	0,435
7	Masc	45	+	+	Assoalho	2	3	X	IVB	–	0,37
8	Masc	56	N.A.	N.A.	Assoalho	4	2b	0	IVA	–	0,47
9	Fem	72	+	–	Língua	X	X	X	N.A.	–	1,1025
10	Masc	45	+	+	Assoalho	4	2b	0	IVA	–	0,17
11	Masc	45	+	+	Língua	2	3	X	IVB	–	0,18
12	Fem	25	–	–	Assoalho	3	2b	1	IVA	–	0,325
13	Fem	76	N.A.	N.A.	Língua	X	X	X	N.A.	–	0,6125
14	Masc	79	+	–	Gengiva	X	X	X	N.A.	–	0,7175
15	Fem	67	+	+	Língua	1	0	X	I	–	0,2375
16	Masc	34	+	+	Gengiva	2	X	X	II	–	0,0325
17	Masc	56	N.A.	N.A.	Língua	3	2	X	IVA	–	0,19
18	Masc	46	+	+	Gengiva	4	3	X	IVB	–	0,22
19	Masc	41	N.A.	N.A.	Gengiva	3	X	X	III	–	0,1795
20	Masc	41	+	+	Assoalho	3	2	0	IVA	–	0,0375

N.A.: dado não avaliado (ausência de informações no prontuário)

*Casos 2 e 3 também apresentaram lesão em assoalho.

Continuação - Tabela 13. Dados dos pacientes – Carcinoma Espinocelular de Boca

Paciente	Característica Queratinizante	Característica Basalóide	p16 –carcinoma invasivo			p16 – epitélio adjacente			
			Presença	Intensidade	Distribuição	Presença	Intensidade	Distribuição	Células
1	–	–	+	2	Esparsa	–	–	–	–
2	+	–	–	–	–	+	1	Focal	Sf
3	+	–	–	–	–	–	–	–	–
4	+	–	–	–	–	–	–	–	–
5	+	–	–	–	–	+	1	Focal	B, Sb
6	+	–	–	–	–	–	–	–	–
7	–	–	–	–	–	–	–	–	–
8	+	–	–	–	–	–	–	–	–
9	+	–	–	–	–	+	2	Esparsa	B, Sb
10	–	–	–	–	–	–	–	–	–
11	–	–	–	–	–	–	–	–	–
12	+	–	+	4	Uniforme	–	–	–	–
13	+	–	+	3	Uniforme	+	2	Esparsa	B
14	–	–	–	–	–	+	1	Esparsa	B, Sb
15	+	–	–	–	–	–	–	–	–
16	+	–	–	–	–	+	1	Esparsa	B, Sb
17	–	–	–	–	–	–	–	–	–
18	+	–	+	1	Esparsa	–	–	–	–
19	+	–	+	2	Uniforme	–	–	–	–
20	+	–	–	–	–	+	2	Uniforme	B, Sb

Intensidade: 1 (até 10%), 2 (10-30%), 3 (30-70%), 4 (mais de 70%)

Células: B (Basal), Sb (Supra-basal), Sf (Superficial)

Tabela 14. Dados dos pacientes – Carcinoma Espinocelular de Orofaringe

Paciente	Gênero	Idade Diagnóstico	Fumante	Etilista	Localização*	T	N	M	Estágio do Tumor	PCR HPV	Quantificação DNA
1	Fem	56	+	+	Base língua	4b	2	X	IVB	–	0,27
2	Masc	54	N.A.	N.A.	Palato mole	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	–	0,1325
3	Masc	50	N.A.	N.A.	Amígdala	1	1	1	I	–	0,1775
4	Fem	59	–	–	Palato mole	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	–	0,325
5	Fem	60	+	–	Palato mole	1	0	0	I	–	0,11
6	Fem	46	+	+	Palato mole	4b	2b	X	IVB	–	0,023
7	Masc	66	+	+	Palato mole	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	–	0,1775
8	Masc	50	+	+	Base língua	4a	2b	X	IVA	–	0,1275
9	Masc	59	+	–	Palato mole	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	–	0,2575
10	Masc	57	N.A.	N.A.	Pilar	3	0	0	III	–	0,33
11	Fem	69	+	–	Pilar	3p	2	1	IVC	–	0,7825
12	Masc	58	–	–	Palato mole	2	0	X	II	–	0,15
13	Masc	58	+	–	Palato mole	2	3	X	IVB	–	0,18
14	Masc	52	+	+	Base língua	3	2	X	IVA		0,0475

N.A.: dado não avaliado (ausência de informações no prontuário)

* casos 1, 2, 4 e 9 também apresentaram lesão em pilares amigdalianos.

Continuação - Tabela 14. Dados dos pacientes – Carcinoma Espinocelular de Orofaringe

Paciente	Característica Queratinizante	Característica Basalóide	p16 –carcinoma invasivo			p16 – epitélio adjacente			
			Presença	Intensidade	Distribuição	Presença	Intensidade	Distribuição	Células*
1	+	–	+	2	Focal	+	2	Esparsa	B, I
2	+	–	+	3	Uniforme	+	1	Focal	B
3	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4	–	+	–	–	–	+	2	Focal	B, Sb
5	–	–	–	–	–	–	–	–	–
6	+	–	+	1	Focal	–	–	–	–
7	+	–	–	–	–	–	–	–	–
8	+	–	–	–	–	–	–	–	–
9	–	–	–	–	–	–	–	–	–
10	+	–	+	1	Focal	+	3	Uniforme	B, Sb
11	+	–	+	4	Uniforme	–	–	–	–
12	–	–	–	–	–	–	–	–	–
13	–	–	–	–	–	–	–	–	–
14	–	–	–	–	–	+	1	Esparsa	B, Sb

*Células: B (Basal), Sb (Supra-basal), I (Intermediária), Sf (Superficial)

APÊNDICE 2 – PROTOCOLO DE IMUNO-HISTOQUÍMICA PARA p16

CINtec® Histology Kit

1. Desparafinizar o corte de tecido e levar à água
2. Recuperação do epítipo
 - a. Usar tampão Tris-EDTA pH 9- diluir 450ml dH₂O e 50ml de tampão
 - b. Colocar os cortes em recipiente com tampão
 - c. Cobrir com papel-filme e colocar no microondas em potência 8 por 20 minutos (90 a 96°C)
 - d. Deixar resfriar por 20 minutos
3. Desenhar nas lâminas usando caneta Dako e imergir o corte em PBS
4. Reagente bloqueador de peroxidase (P200)
 - a. Aplicar o reagente para cobrir a amostra (P150)
 - b. Incubar por 5 minutos
 - c. Lavar com PBS por 5 minutos
5. Anticorpo primário
 - a. Aplicar anticorpo primário ou controle de reagente negativo para cobrir o espécime
 - b. Incubar por 30 minutos (agitar)
 - c. Lavar com PBS por 5 minutos
6. Reagente de visualização
 - a. Cobrir a amostra com reagente de visualização
 - b. Incubar por 30 minutos (agitar)
 - c. Lavar com PBS por 5 minutos
7. Solução de substrato cromógeno (DAB)
 - a. Compor DAB 1 gota: 2ml
 - b. Cobrir a amostra com solução
 - c. Incubar por 10 minutos
 - d. Lavar com PBS
 - e. Lavar com água destilada
8. Contracorar em aparelho de coloração e fazer montagem.

APÊNDICE 3 – PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO DE DNA

Extração de DNA – Kit Qiagen (maiores informações no manual)

1. Utilizando um bisturi, retire o excesso de parafina da amostra do bloco.
2. Corte secções de 5-10µm de espessura (se a superfície da amostra tiver sido exposta ao ar, descarte as primeiras 2-3 secções).
3. Coloque as secções em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ou 2 mL e adicione 1 mL de xilol à amostra. Feche a tampa e centrifugue (vórtex) por 10s.
4. Centrifugue em velocidade máxima por 2 min à temperatura ambiente.
5. Remova o sobrenadante pipetando. Não remova nenhuma parte do pellet.
6. Adicione 1 mL de etanol (96-100%) ao pellet, e misture utilizando vórtex. O etanol extrai o xilol residual da amostra.
7. Centrifugue em velocidade máxima por 2 min à temperatura ambiente.
8. Remova o sobrenadante pipetando. Não remova nenhuma parte do pellet. Cuidadosamente Remova qualquer etanol residual usando uma ponta de pipeta fina.
9. Abra o tubo e incube à temperatura ambiente (15-25°C) ou até 37°C. Incube por 10 minutos ou até que todo o etanol residual tenha evaporado.
10. Ressuspenda o pellet em 180µL de tampão ATL. Adicione 20µL de proteinase K, e misture utilizando o vórtex.
11. Incube a 56°C por 1 hora (ou até que a amostra tenha lisado completamente).
12. Incube a 90°C por 1 hora.

A incubação a 90°C em tampão ATL parcialmente reverte a modificação dos ácidos nucléicos pelo formaldeído. Tempos mais longos ou temperaturas mais altas de incubação podem resultar em DNA mais fragmentado. Se estiver usando apenas um bloco de aquecimento, deixe a amostra à temperatura ambiente após a incubação a 56°C até que o bloco de aquecimento tenha atingido 90°C.

13. Centrifugue o tubo de 1,5mL para remover gotas de dentro da tampa.
14. Adicionar 200µL de tampão AL para a amostra, e misturar bem com o vórtex. Em seguida, adicionar 200µL de etanol (96-100%) e misturar novamente com vórtex. É essencial que a amostra de tampão AL e etanol sejam misturadas imediatamente e completamente como o vórtex ou pipetando para produzir uma solução homogênea. Tampão AL e álcool podem ser misturados e somados em uma única etapa para economizar tempo durante o processamento de várias amostras. Um precipitado branco pode se formar sobre a adição de tampão AL e etanol. Esse precipitado não interfere com o processo QIAamp.
15. Centrifugar o tubo de 1,5ml para remover gotas de dentro da tampa.
16. Transferir cuidadosamente todo o lisado para a coluna Min Elute QIAamp (em um tubo de coleta de 2ml), sem molhar a borda, fechar a tampa, e centrifugar a 6000x g (8000rpm) por 1 minuto. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um tubo limpo de 2ml, e descarte o tubo de coleta contendo o escoamento. Se o lisado não passou completamente através da membrana após a centrifugação, centrifugar

novamente a uma velocidade maior até que a coluna QIAamp MinElute esteja vazia.

17. Cuidadosamente abra a coluna QIAamp MinElute e adicione 500µL de tampão AW1 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue a 6000x g (8000rpm) por 1 minuto. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um tubo limpo de 2 ml, e descarte o tubo de coleta contendo o escoamento.
18. Cuidadosamente abra a coluna QIAamp MinElute e adicione 500µl de tampão AW2 sem molhar a borda. Feche a tampa e centrifugue a 6000x g (8000rpm) por 1 minuto. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um tubo limpo de 2 ml, e descarte o tubo de coleta contendo o escoamento. O contato entre a coluna MinElute QIAamp e o escoamento devem ser evitados. Algumas centrífugas podem vibrar em desaceleração, resultando em fluxo contínuo, que contém etanol, entre em contato com a coluna MinElute QIAamp. Tome cuidado ao remover a coluna QIAamp MinElute o tubo de coleta a partir do rotor, de modo que o fluxo não entre em contato com a coluna MinElute QIAamp.
19. Centrifugar à velocidade máxima (20.000 xg; 14.000rpm) por 3 minutos para secar completamente a membrana. Esta etapa é necessária, uma vez que o etanol pode interferir com algumas reações.
20. Coloque a coluna QIAamp MinElute em um tubo limpo para microcentrífuga de 1,5ml (não fornecidos) e descarte o tubo de coleta contendo o escoamento. Cuidadosamente abra a tampa da coluna MinElute QIAamp e aplique 20-100µL de tampão ATE para o centro da membrana.
Importante: certifique-se que o tampão ATE esteja equilibrado à temperatura ambiente. Se estiver usando pequenos volumes de eluição (50µL), dispense o tampão ATE para o centro da membrana para garantir eluição completa do DNA ligado. Colunas QIAamp MinElute fornecem flexibilidade na escolha do volume da eluição. Escolha um volume de acordo com os requisitos da aplicação à jusante. O volume será de até 5µL menos do que o volume de solução de eluição aplicada à coluna.
21. Feche a tampa e deixe em temperatura ambiente (15-25°C) por 1 minuto. Centrifugar à velocidade máxima (20.000 sg; 14.000rpm) por 1 minuto. Incubar a coluna QIAamp MinElute carregado com tampão ATE por 5 minutos em temperatura ambiente antes da centrifugação geralmente aumenta o rendimento do DNA.

ANEXO A – APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade de Brasília
Faculdade de Ciências da Saúde
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FS

PROCESSO DE ANÁLISE DE PROJETO DE PESQUISA

Registro do Projeto no CEP: **086/10**

Título do Projeto: “Papel do Papilomavírus Humano na patogênese das lesões orais potencialmente malignas e no câncer de cavidade oral e orofaringe”.

Pesquisadora Responsável: Eliete Neves da Silva Guerra

Data de Entrada: 24/06/10

Com base na Resolução 196/96, do CNS/MS, que regulamenta a ética em pesquisa com seres humanos, o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, após análise dos aspectos éticos e do contexto técnico-científico, resolveu **APROVAR** o projeto **086/10** com o título: “Papel do Papilomavírus Humano na patogênese das lesões orais potencialmente malignas e no câncer de cavidade oral e orofaringe”, analisado na 6ª Reunião Ordinária, realizada no dia 13 de julho de 2010.

A pesquisadora responsável fica, desde já, notificada da obrigatoriedade da apresentação de um relatório semestral e relatório final sucinto e objetivo sobre o desenvolvimento do Projeto, no prazo de 1 (um) ano a contar da presente data (item VII.13 da Resolução 196/96).

Brasília, 11 de agosto de 2010.

Prof. Volnei Garrafa
Coordenador do CEP-FS/UnB