

ANA ELIZIA MASCARENHAS MARQUES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM OROFARINGE DE PACIENTES COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE ALTO GRAU E CARCINOMA INVASIVO DO COLO DO ÚTERO, E DE SEUS COMPANHEIROS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA, BRASÍLIA, DF.**

BRASÍLIA, 2012

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

ANA ELIZIA MASCARENHAS MARQUES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM OROFARINGE DE PACIENTES COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE ALTO GRAU E CARCINOMA INVASIVO DO COLO DO ÚTERO, E DE SEUS COMPANHEIROS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA, BRASÍLIA, DF.**

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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliete Neves da Silva Guerra

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Tadeu de Souza Figueiredo

BRASÍLIA

2012

ANA ELIZIA MASCARENHAS MARQUES

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM OROFARINGE DE PACIENTES COM NEOPLASIA INTRA-EPITELIAL ESCAMOSA DE ALTO GRAU E CARCINOMA INVASIVO DO COLO DO ÚTERO, E DE SEUS COMPANHEIROS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA, BRASÍLIA, DF.**

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 17 de dezembro de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

Eliete Neves da Silva Guerra - (presidente)

Universidade de Brasília – UnB

Edgar Merchan-Hamann - (examinador interno)

Universidade de Brasília – UnB

Simone de Queiroz Chaves Lourenço – (examinador externo)

Universidade Federal Fluminense – UFF

Paulo Tadeu de Souza Figueiredo – (suplente)

Universidade de Brasília - UnB

*Dedico este trabalho com todo o meu amor aos meus preciosos pais, que de maneira tão natural me educaram para a vida!*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu Mestre, Jesus, pela vida, capacitação e cuidado, fazendo com que o desenvolvimento deste trabalho fosse realizado de forma agradável e prazerosa. Obrigada por tudo, Senhor!

À minha querida orientadora, professora Eliete Guerra, pela dedicação e completa atenção ao longo da pesquisa. Obrigada pelo aprendizado, por acreditar em mim e ser meu exemplo na profissão, desde a graduação. É um privilégio trabalhar com você. Serei eternamente grata!

Ao professor Paulo Tadeu Figueiredo, por ser tão solícito e generoso, apoiando-me sempre. Minha sincera gratidão!

À professora Ceres Oyama, ginecologista e obstetra, pelo apoio fundamental nos concedendo a amostra de pacientes participantes do estudo.

Ao professor An Tien Li, pela sabedoria admirável, por contribuir na análise estatística e pelas palavras de ânimo em muitos momentos.

À professora Simone Lourenço e ao professor Edgar Merchan-Hamann, por prontamente aceitarem participar da minha banca. Muito obrigada!

A todos os pacientes que participaram da pesquisa, pela confiança, disponibilidade, por cada conversa e história de vida compartilhada. Espero ter sido útil a vocês que muito foram para a execução deste trabalho!

Aos meus maravilhosos pais Firmino e Lêda, que mesmo distantes fisicamente, proporcionam-me o suporte essencial para alcançar os mais altos voos que meu coração anseia. Vocês são os melhores! Sou grata a Deus todos os dias!

Aos meus irmãos Plauto e Renan, que singularmente compreendem tão bem minha ausência e estão sempre torcendo por mim.

Aos meus demais familiares, tios, primos e avó, pela expectativa e apoio depositados. Amo-os!

À amiga e companheira de mestrado, Marina, por todo auxílio e companheirismo. Este trabalho também é seu!

À minha amiga Carol, que sonhou este mestrado comigo, incentivando-me e alegrando-se com cada degrau alcançado. Sou muito grata por sua amizade!

Às lindas Lais e Ana Luiza, pela imensa contribuição durante o desenvolvimento deste trabalho. De coração, muito obrigada!

À Silvinha, que muito contribuiu com sua experiência, e à Dani, que tanto nos acrescentou este ano com sua chegada ao Laboratório de Histopatologia Bucal.

À Fabiana, pelo apoio na clínica e pelas incentivadoras e confortantes palavras de experiência.

Ao Alexandre, por introduzir-me nos experimentos laboratoriais, e de forma bastante didática ensinar tão bem o manejo dos aparelhos, instrumentos e materiais. Obrigada pelo apoio, Alexandre!

À Glorinha e à Rilva, que generosamente me deram toda assistência técnica nos laboratórios de Histopatologia Bucal e Farmacologia, respectivamente.

Aos graduandos Gabriel, Danilo, Jéssica e Tassiana, pela prazerosa convivência e trabalho em conjunto.

A todos os demais professores que contribuíram para o meu aperfeiçoamento acadêmico, em especial aos professores André Leite, Paulo Yamaguti, Nilce de Melo, Ana Carolina Acevedo, Heliana Mestrinho e Lilian de Paula.

Aos meus amigos, que mesmo não participando diretamente da pesquisa, foram alicerces em todos os momentos. Aqui destaco: Paula, Andrea, Tiago, Pedro, Robertson, Cíntia, Gabi, Raila, Silvinha, Pedrina, Priscilla, Jennifer, Iedinha e Barbra. Obrigada por entenderem minha constante ausência e pelas palavras edificadoras.

À Secretaria de Pós-graduação em Ciências da Saúde e instituições de fomento: DPP, FINATEC, CNPq.

**Com muito carinho, obrigada!!!**

“Porque cada um, independente das habilitações que tenha, ao menos uma vez na vida fez ou disse coisas muito acima da sua natureza e condição, e se a essas pessoas pudéssemos retirar do quotidiano pardo em que vão perdendo os contornos, ou elas a si próprias se retirassem de malhas e prisões, quantas mais maravilhas seriam capazes de obrar, que pedaços de conhecimento profundo poderiam comunicar, porque cada um de nós sabe infinitamente mais do que julga e cada um dos outros infinitamente mais do que neles aceitamos conhecer.”

**José Saramago (A Jangada de Pedra)**

## RESUMO

Embora a história natural da infecção do colo do útero e oral pelo Papilomavírus Humano (HPV) tenha sido intensamente investigada, a capacidade que o HPV possui de infectar as mucosas oral e genital no mesmo indivíduo e o potencial de transmissão do vírus, ainda não estão bem elucidados. Este estudo analisou a presença da infecção por HPV em mucosa de orofaringe de mulheres com neoplasia intra-epitelial de alto grau e carcinoma invasivo do colo do útero, acompanhadas na Divisão de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário de Brasília. Também analisou-se a presença da infecção por HPV em orofaringe dos parceiros sexuais atuais das mulheres. Um total de 100 pacientes participou do estudo, dentre os quais 70 mulheres e 30 parceiros do gênero masculino. Os dados demográficos, história clínica, hábitos e perfil sociocomportamental foram avaliados por meio de entrevistas. Realizou-se ainda perguntas relacionadas à associação da presença do HPV na orofaringe com o comportamento sexual dos pacientes. Células da mucosa orofaríngea foram coletadas por meio de raspado com escova citológica estéril. Foi realizada avaliação quantitativa do DNA por espectrofotometria e qualitativa por meio da técnica de PCR, utilizando o padrão de amplificação do gene da proteína  $\beta$ -globina. A verificação do DNA do HPV foi realizada, utilizando a técnica do nested PCR com os primers PGMY/GP5/6. Em todas as amostras o DNA apresentou ótimo grau de pureza e rendimento, além de mostrar-se íntegro na maioria dos casos. A infecção orofaríngea por HPV foi detectada em 4/100 (4%) casos, estando presente em 1/70 (1,43%) mulher e 3/30 (10%) de seus parceiros. Não houve correlação entre os fatores de risco do comportamento sexual avaliados e a transmissão orogenital. Observou-se baixa prevalência de infecção orogenital nas mulheres, como também de infecção orofaríngea nos parceiros. Assim, a baixa prevalência não demonstrou associação entre a presença do HPV na mucosa de orofaringe e do colo do útero, sugerindo que a presença de neoplasia intra-epitelial de alto grau e carcinoma invasivo do colo do útero não predispõe à infecção oral pelo HPV, não se relacionando à história do hábito de sexo oral. Porém, verificou-se uma tendência de maior presença do HPV na orofaringe dos parceiros, necessitando de estudos com maior amostra para definir a capacidade da transmissão orogenital.

**Palavras-chave:** Papilomavírus Humano; câncer oral; DNA; neoplasia intra-epitelial do colo do útero; mucosa de orofaringe; raspado oral; transmissão orogenital.

## ABSTRACT

Although the natural history of Human Papillomavirus (HPV) infection of uterine cervix and oral cavity has been extensively researched, the capability of this virus to infect oral and genital mucosae in the same individual and the virus transmission potential are not yet well explained. This study analyzed the presence of HPV infection in oropharynx mucosa of women with high-grade intraepithelial neoplasia or invasive cervical carcinoma who were treated at the Gynecology and Obstetrics Division of the University Hospital of Brasilia. It also analyzed the presence of HPV infection in the oropharynx of their current sexual partners. A total of 100 patients, of which 70 were women and 30 male sexual partners, composed this study. Demographic data, clinical history, habits and socio-behavioral profile were assessed through interviewing. Association of the presence of HPV in oropharynx with the sexual behavior of the patients was also evaluated. Oropharyngeal mucosa cells were collected through swab with a sterilized cytological brush. Quantitative evaluation of the DNA was performed with spectrophotometry, while qualitative evaluation with PCR, being applied the  $\beta$ -globin protein gene amplification pattern. HPV DNA was verified using the nested PCR technique, with PGYM/GP5/6 primers. In all samples, DNA presented a high grade of purity and efficiency, besides being integral in most of the cases. Oropharyngeal infection was found in 4/100 (4%) cases, being present in 1/70 (1,43%) woman and 3/30 (10%) male partners. Correlation between sexual behavior risk factors and orogenital transmission was not observed. Low prevalence of orogenital infection in women, as well as oropharyngeal infection in male partners, was also observed. Therefore, such low prevalence did not evince the association of HPV presence in oropharynx and in cervix, suggesting that the presence of high-grade intraepithelial neoplasia or of invasive cervical carcinoma does not predispose to HPV oral infection, not being correlated to the history of oral sex practice. However, it was observed a tendency of greater HPV presence in oropharynx within the male partners group, which requires studies with a larger sampling universe, so that orogenital transmission capability might be defined.

**Keywords:** Human Papillomavirus; oral cancer; DNA; intraepithelial cervical neoplasia; oropharynx mucosa; oral swab; orogenital transmission.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura gênica do HPV.....	21
Figura 2: Diagrama da transformação maligna nos queratinócitos causada pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV.....	25
Figura 3: Progressão para o câncer cervical mediada por HPV.....	29
Figura 4: Método de coleta do raspado na região de mucosa de orofaringe com escova citológica.....	46
Figura 5: Padrão eletroforético do DNA amplificado do gene da proteína $\beta$ -globina obtido após PCR.....	62
Figura 6: Padrão eletroforético do DNA do HPV, pela amplificação da sequência gênica da região conservada L1 do vírus, por meio da técnica do nested PCR (PGMY09/11 e GP5+/6+, que revelou a presença do vírus em quatro amostras, 39 e 45, 46 e 50.....	64

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diagrama do PCR para a beta-globina, utilizando as sequências gênicas do conjunto de primers Forward (F) e Reverse (R).....	50
Tabela 2: Tabela com as sequências gênicas dos primers PGMY09/11 utilizados no primeiro PCR para verificação da presença de HPV pela amplificação da sequência gênica conservada L1.....	51
Tabela 3: Tabela com as sequências gênicas dos primers GP5+/6+ utilizados no PCR secundário para verificação da presença de HPV pela amplificação da sequência gênica conservada L1.....	52
Tabela 4: Achados sistêmicos da história clínica das mulheres e parceiros – 70 mulheres e 30 homens.....	55
Tabela 5: Achados clínicos ao exame extrabucal e intrabucal das mulheres e parceiros – 70 mulheres e 30 homens.....	56
Tabela 6: Perfil sociocomportamental das pacientes participantes do estudo – n=70.....	59
Tabela 7: Perfil sociocomportamental dos parceiros sexuais atuais das pacientes – n= 30.....	60
Tabela 8: Características do comportamento sexual e sociocomportamental dos pacientes infectados por HPV em orofaringe – 1 mulher e 3 parceiros.....	64
Tabela 9: Análise estatística da presença do HPV em orofaringe e das variáveis de risco para as mulheres com doença do colo do útero – n=70.....	66
Tabela 10: Análise estatística da presença do HPV em orofaringe e das variáveis de risco para os parceiros sexuais atuais – n=30.....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A - Absorbância

ASO4 - sulfato de hidroxifosfato de alumínio

ATM - articulação temporo-mandibular

Bp - pares de base

Brd4 - proteína bromo-dominante

CDK - quinase dependente de ciclina

CKI - inibidor de quinase dependente de ciclina

CSCC - carcinoma de células escamosas do colo do útero

CUL2 - ligase de ubiquitina cullin 2

DGO - Divisão de Ginecologia e Obstetrícia

dNTPs - desoxirribonucleotídeos fosfatados

DF - Distrito Federal

DO - densidade óptica

DST - doença sexualmente transmissível

EDTA - etilenodiamino tetra-acético

EGF - fator de crescimento epidermal

EGFR - receptor do fator de crescimento epidermal

EtBr - brometo de etídio

F - primer Forward

FFPE - fixado em formalina e emblocado em parafina

FS - Faculdade de Saúde

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

HNSCC - carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço

HPV - Papilomavírus Humano

hTERT – enzima telomerase

HUB - Hospital Universitário de Brasília

IARC - Agência Internacional de Pesquisa do Câncer

IgG - imunoglobulina G

IHC - imuno-histoquímica

INCA - Instituto Nacional de Câncer

IC - intervalo de confiança

ISH - hibridização *in situ*

LCR - região de controle longa

MgCl<sub>2</sub> - cloreto de magnésio

NIC - neoplasia intra-epitelial cervical

OPSCC - carcinoma de células escamosas de orofaringe

OSCC - carcinoma de células escamosas oral

Pap - Papanicolau

PCR - Reação em Cadeia de Polimerase

PBMCs - células mononucleares do sangue periférico

pRb - proteína supressora de tumor do retinoblastoma

R - primer Reverse

RPM - rotações por minuto

shRNAs - pequenos RNAs de interferência

SUS - Sistema Único de Saúde

Tampão TAE - tris-acetato-EDTA

Tampão TE – Tris-EDTA

VLPs - partículas semelhantes a vírus

UV - ultravioleta

UnB - Universidade de Brasília

$\beta$ -globina – beta-globina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O PAPILOMAVÍRUS HUMANO .....	19
<b>2.1.1 Carcinogênese .....</b>	<b>23</b>
2.2 DOENÇAS HUMANAS ASSOCIADAS AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO .....	28
<b>2.2.1 Doença Genital.....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.2 Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (HNSCC) ...</b>	<b>32</b>
2.3 TRANSMISSÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	34
2.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	36
2.5 VACINAS PARA O PAPILOMAVÍRUS HUMANO .....	39
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	41
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 AMOSTRA DO ESTUDO .....	43
4.2 EXAME CLÍNICO .....	44
4.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO .....	46
4.4 EXTRAÇÃO DE DNA.....	47
4.5 QUANTIFICAÇÃO, PUREZA E RENDIMENTO DO DNA.....	48
4.6 QUALIDADE DO DNA .....	49
4.7 DETECÇÃO DO HPV .....	50
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>55</b>
5.1 EXAME CLÍNICO .....	55
5.2 ANÁLISE DO PERFIL SOCIOCOMPORTAMENTAL DA AMOSTRA.....	57

<b>5.2.1 Mulheres</b> .....	<b>57</b>
<b>5.2.2 Parceiros</b> .....	<b>58</b>
5.3 ANÁLISE DA QUANTIFICAÇÃO, PUREZA E RENDIMENTO DO DNA .....	61
5.4 ANÁLISE QUALITATIVA DO DNA .....	61
5.5 ANÁLISE DA DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO .....	63
5.6 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DE RISCO DA AMOSTRA .....	65
<b>5.6.1 Mulheres</b> .....	<b>65</b>
<b>5.6.2 Parceiros</b> .....	<b>67</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>77</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>78</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>101</b>
<b>ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	<b>101</b>
<b>ANEXO B – PRONTUÁRIO CLÍNICO DAS MULHERES</b> .....	<b>103</b>
<b>ANEXO C – PRONTUÁRIO CLÍNICO DOS COMPANHEIROS</b> .....	<b>108</b>
<b>ANEXO D - APROVAÇÃO PELO COMITÊ NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA, REGISTRO Nº 106/10</b> .....	<b>112</b>
<b>ANEXO E – RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO, GRAU DE PUREZA E RENDIMENTO DOS CASOS ANALISADOS</b> .....	<b>113</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas do colo do útero, também conhecido como cervical, origina-se de lesões potencialmente malignas com crescimento celular displásico, denominadas neoplasias intra-epiteliais cervicais (NIC). As NICs são classificadas em NIC1, NIC2 ou NIC3, dependendo da gravidade da lesão (Klaes *et al.*, 1999). O carcinoma do colo do útero representa a segunda neoplasia maligna mais comum em mulheres, depois do câncer de mama e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil (INCA, 2012). Dados da Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC) relataram 530.232 novos casos de câncer do colo do útero e 275.008 óbitos em 2008, com mais de 83% dos casos encontrados em países em desenvolvimento (IARC, Bray *et al.*, 2012). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) registrou estimativa de 17.540 novos casos no Brasil, em 2012, e 4.986 óbitos em 2010 (INCA). A principal alteração que pode levar a esse tipo de câncer é a infecção pelo Papilomavírus Humano, o HPV, com alguns subtipos de alto risco, também chamados oncogênicos, relacionados aos tumores malignos.

O HPV é um grupo de vírus DNA hospedeiro-específico, com especificidade singular pelas células epiteliais. Particularmente os tipos 16 e 18, constituem a principal causa de câncer do colo do útero (zur Hausen, 1999). Os pequenos filamentos duplos de DNA do HPV foram primeiramente identificados, clonados e sequenciados a partir de amostras tumorais do colo do útero e posteriormente estabelecidos como importantes agentes causadores do desenvolvimento dessa neoplasia. A descoberta homenageou o seu descobridor Harald zur Hausen com a atribuição do Prêmio Nobel da Fisiologia e Medicina no ano de 2008 (Shukla *et al.*, 2009). Além disso, investigações epidemiológicas confirmaram o papel causal do HPV na maioria dos outros tipos de tumores malignos anogenitais. Cada vez mais evidências epidemiológicas e moleculares também indicam o papel do HPV na etiologia de um subconjunto de carcinomas do trato aerodigestivo superior (Hussain *et al.*, 2008).

Estima-se que o HPV seja responsável por mais de 5% do total anual de câncer em todo o mundo (Parkin, 2006). A ampla especificidade do vírus pelas células epiteliais determina importante papel na patogênese do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Gillison *et al.*, 2000; Termine *et al.*, 2012).

O carcinoma de células escamosas oral (OSCC) é o sexto tipo de câncer mais comum, com uma incidência anual de aproximadamente 400.000 casos em todo o mundo. Embora os principais fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço continuem sendo o uso de tabaco e álcool, o HPV tem sido etiológicamente associado a 20-25% dos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, especialmente na orofaringe (Parkin, 2001; Parkin *et al.*, 2005; Hennessey *et al.*, 2009; Chung & Gillison, 2009). Um estudo realizado por Thavaraj *et al.* (2011) observou a presença de HPV em 61% (87/142) dos casos analisados de carcinoma de células escamosas de tonsila, utilizando a combinação dos métodos de imunohistoquímica (IHC) para o p16, hibridização *in situ* (ISH) e Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) para o HPV.

Há evidências de que o carcinoma de células escamosas de orofaringe associado ao HPV seja biologicamente distinto e os pacientes apresentem uma maior sobrevida quando comparados aos tumores HPV-negativos, bem como respondem melhor aos tratamentos de radio e quimioterapia (Ragin & Taioli, 2007; Fakhry *et al.*, 2008; Gillison, 2009). Por esta razão, o conhecimento etiológico destes carcinomas fornece subsídio para melhor estabelecimento do prognóstico e planejamento terapêutico.

Em contraste com a riqueza de dados disponíveis sobre a infecção por HPV genital, pouco ainda se conhece acerca da infecção oral pelo vírus (Bosch *et al.*, 2008; Schiffman *et al.*, 2009; Scarinci *et al.*, 2010). Um ponto questionável na infecção oral por HPV é se ela pode desenvolver-se a partir de uma infecção genital causada pelo HPV, por meio da transmissão sexual pelo contato orogenital, ou se pode ser considerada um evento independente (Adelstein *et al.*, 2009; Nair & Pillai, 2005). Pertinente a esta questão, é importante conhecer a frequência de infecção oral por HPV em mulheres com doença do colo do útero (Termine *et al.*, 2011).

Um estudo realizado por Hemminki *et al.* (2000) verificou que o comportamento sexual é um fator relevante de transmissão de infecções por HPV e

supõe-se contribuir para os carcinomas do trato aerodigestivo superior. Nesse estudo observou-se um aumento da ocorrência do câncer de tonsila em mulheres com idade igual ou superior a 50 anos, diagnosticadas com carcinoma *in situ* do colo do útero. Além disso, uma significativa ocorrência do câncer de tonsila entre os maridos dessas pacientes forneceu um suporte adicional para o sugerido papel do HPV na carcinogênese da orofaringe.

Embora atualmente não existam padrões internacionais reconhecidos para detecção de HPV em câncer de cabeça e pescoço, dois métodos diagnósticos têm sido amplamente utilizados (Braakhuis *et al.*, 2009). O primeiro utiliza a IHC do p16 seguida da técnica de PCR para o DNA do HPV. O segundo envolve a IHC do p16 seguida da detecção do DNA do HPV por ISH (Singhi & Westra, 2010; Thavaraj *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que o DNA isolado a partir de células epiteliais por diferentes protocolos podem ser usados com sucesso para realizar ensaios baseados em PCR. Tal fato é apoiado pela alta ou completa concordância de resultados utilizando o PCR, quando analisadas amostras de DNA isolado de células bucais de um indivíduo (Garcia-Closas *et al.*, 2001). A coleta de amostras de DNA a partir de células da mucosa oral pela técnica do raspado fornece material suficiente para análises por PCR, além de possuir vantagens, como ser menos invasiva, indolor, de baixo custo, fácil transporte e armazenamento (Steinberg *et al.*, 2002; Mullet *et al.*, 2005).

Com base no aumento de estudos que relatam o papel do HPV de alto-risco na etiologia dos carcinomas de cabeça e pescoço e na sua provável relação com a transmissão orogenital, é importante conhecer a provável transmissão oral do HPV em pacientes com doença do colo do útero causada pelo vírus, bem como nos parceiros sexuais dessas mulheres.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O PAPILOMAVÍRUS HUMANO

O Papilomavírus Humano (HPV) é um grupo de vírus DNA hospedeiro-específico de cadeia dupla e circular, da família Papilomaviridae (zur Hausen, 1996). O HPV possui uma especificidade singular pelas células epiteliais, as quais são infectadas através de rupturas causadas pelo vírus na superfície epitelial, e é mantido no núcleo das células da camada basal. Nas células epiteliais, o DNA do HPV se replica e atinge um número elevado de cópias (Stubenrauch & Laimins, 1999). O vírus apresenta um envoltório capsídico icosaédrico, com 52 a 55 nanômetros (nm) de diâmetro, que contém um genoma de aproximadamente 8.000 pares de base (bp), não-envelopado, e codifica duas proteínas reguladoras produzidas pelos genes iniciais, E1 e E2, três oncoproteínas, E5, E6 e E7, e duas proteínas do capsídio estrutural, L1 e L2 (Rous & Beard, 1935).

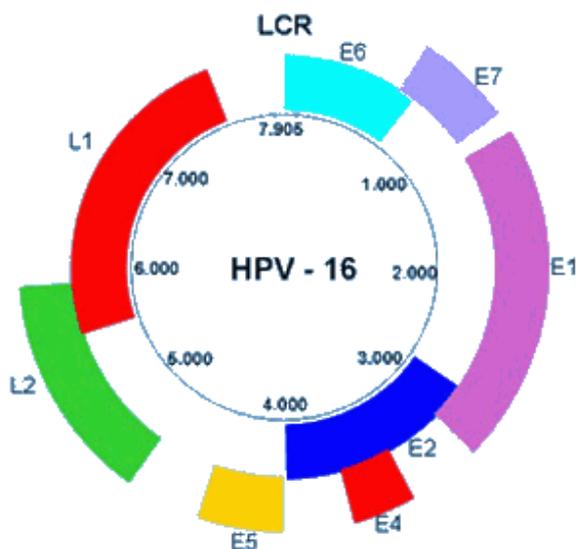
Mais de 100 tipos diferentes de HPV foram identificados e divididos entre aqueles com predileção para infectar a pele e aqueles que infectam superfícies mucosas (Kjaer *et al.*, 2001; Schiffman & Castle, 2003; de Villiers *et al.*, 2004; zur Hausen, 2009). As infecções de mucosa são bem conhecidas pela associação com um espectro de doenças humanas que variam de papilomas ou verrugas benignas a carcinomas invasivos em regiões como colo do útero, vulva, vagina, anus, pênis e mais recentemente na região de cabeça e pescoço (zur Hausen, 2002; de Villiers *et al.*, 2004; McLaughlin-Drubin & Münger, 2009; McLaughlin-Drubin *et al.*, 2012). O laboratório coordenado por Harald zur Hausen foi o primeiro a demonstrar que as verrugas genitais contêm o genoma do HPV (Gissmann & Hausen, 1980; de Villiers *et al.*, 1981).

Os Papilomavírus humanos são classificados como de alto risco e de baixo risco, com base na propensão para causar malignidade. Esta classificação foi mais

precisamente estabelecida para os HPVs mucosos. HPVs de baixo risco, tais como os tipos 6 e 11, induzem hiperproliferações benignas do epitélio, como papilomas ou verrugas. Em contraste, os HPVs de alto risco, tipos oncogênicos, como 16, 18, 31, 33 e 35, foram assim definidos pela forte associação epidemiológica com o câncer do colo do útero. (McDougall, 1994; de Villiers *et al.*, 2005).

O papel carcinogênico do HPV de alto risco remete principalmente a duas oncoproteínas, a E6, a qual promove a degradação da proteína supressora de tumor p53, e a oncoproteína E7, que inativa o gene supressor de tumores pRb (zur Hausen, 2000; Chung & Gillison, 2009). A expressão das proteínas E6 e E7 do HPV resulta na proliferação celular, perda da regulação do ciclo celular, diferenciação celular alterada, aumento da frequência de mutações espontâneas e induzidas, e instabilidade cromossômica (Münger & Howley, 2002). Essas alterações genéticas podem levar à transformação celular e à progressão maligna do epitélio (Chung & Gillison, 2009).

Apenas uma das duas cadeias circulares do DNA genômico do HPV é ativamente transcrita. O genoma pode ser dividido em três partes principais: uma região inicial (E) de 4 quilobases (kb) que codifica proteínas não-estruturais, uma região tardia (L) de 3kb que codifica duas proteínas do capsídio e uma região de controle longa (LCR) de 1kb, não-codificante, que contém uma variedade de elementos reguladores da replicação viral e da expressão gênica. Os genes E e L são numerados de acordo com o tamanho e quanto maior o número, menor o fragmento estrutural correspondente. A estrutura gênica do HPV está demonstrada na **Figura 1**.



**Figura 1: Estrutura gênica do HPV.** O genoma é composto por três partes: região inicial E, região tardia L e região de controle longa LCR.

O ciclo de vida do HPV está intimamente relacionado à diferenciação das células epiteliais infectadas. Inicialmente, o vírus infecta as células da camada basal, a fim de estabelecer uma infecção persistente. A natureza dos receptores do HPV permanece pouco esclarecida (Evander *et al.*, 1997; Stubenrauch & Laimins, 1999; Münger & Howley, 2002). Do mesmo modo, os processos que mediam a captação do vírus, descapsidação e importação nuclear do genoma viral permanecem amplamente desconhecidos. Após a infecção inicial, os episômas virais são mantidos nas células basais, que se dividem assimetricamente e perpendicularmente à membrana basal. Uma célula-filha conserva as características da célula basal enquanto que a outra célula-filha está empenhada na diferenciação. Assim, a célula se retira do ciclo de divisão celular, e é subsequentemente empurrada para cima, no interior da camada espinhosa. Os genes do HPV são divididos entre as duas células-filhas, e um dos maiores desafios do ciclo de vida do Papilomavírus é estabelecer e/ou manter um ambiente de replicação celular competente nos queratinócitos diferenciados (Cheng *et al.*, 1995).

Nas células diferenciadas, o vírus se replica com elevado número de cópias, os genes tardios são expressos e a progênie viral é produzida (Stubenrauch & Laimins, 1999; Munger *et al.*, 2004). Os HPVs são vírus não-líticos e a progênie viral é imersa no epitélio. A proteína E4 do HPV associa-se a filamentos intermediários de

queratina, o que afeta a estabilidade mecânica da rede e facilita a liberação de partículas virais (Duensing *et al.*, 2001).

As proteínas E1 e E2 desempenham um papel importante na replicação do genoma viral. A proteína E2 é um fator de transcrição de ligação de DNA que interage com a sequência ACCN6GGT na LCR viral (McBride *et al.*, 1991). A proteína E2 do HPV de alto risco possui capacidade de atuar como ativadora de transcrição, mas funcionam como repressores transcricionais da expressão de genes virais nos queratinócitos (Phelps & Howley, 1987; Bernard *et al.*, 1989; Demeret *et al.*, 1997). Além de modular a expressão genética viral, a proteína E2 associa-se com a proteína E1 do DNA viral. Esta interação é necessária para o eficiente reconhecimento inicial e replicação do genoma viral (Chiang *et al.*, 1992a; Chiang *et al.*, 1992b). A proteína E2 também desempenha importante função na separação do genoma viral durante a divisão celular, aglomerando os genes virais em cromossomos mitóticos (Skiadopoulos & McBride, 1998). A associação de E2 com cromossomos mitóticos é mediada pela interação com a proteína bromo-dominante humana (Brd4) (You *et al.*, 2004).

Uma vez que os HPVs não codificam outras enzimas necessárias para a replicação do DNA, a produção de genomas virais é inteiramente dependente da maquinaria que sintetiza o DNA celular do hospedeiro. Os HPVs são replicados nas células epiteliais diferenciadas, as quais têm o crescimento impedido e conseqüentemente são incapazes de manter a síntese genômica. Assim, o vírus desenvolve funções que criam e/ou mantêm uma competente replicação celular nos queratinócitos diferenciados infectados. Um aspecto também importante do ciclo de vida do Papilomavírus é o estabelecimento a longo prazo no epitélio, onde as células sofrem diferenciação constantemente e células diferenciadas são perdidas. As estratégias específicas que os HPVs de alto risco desenvolveram para contrariar esses desafios contribuem diretamente para o seu potencial oncogênico (Thorland *et al.*, 2003).

### 2.1.1 Carcinogênese

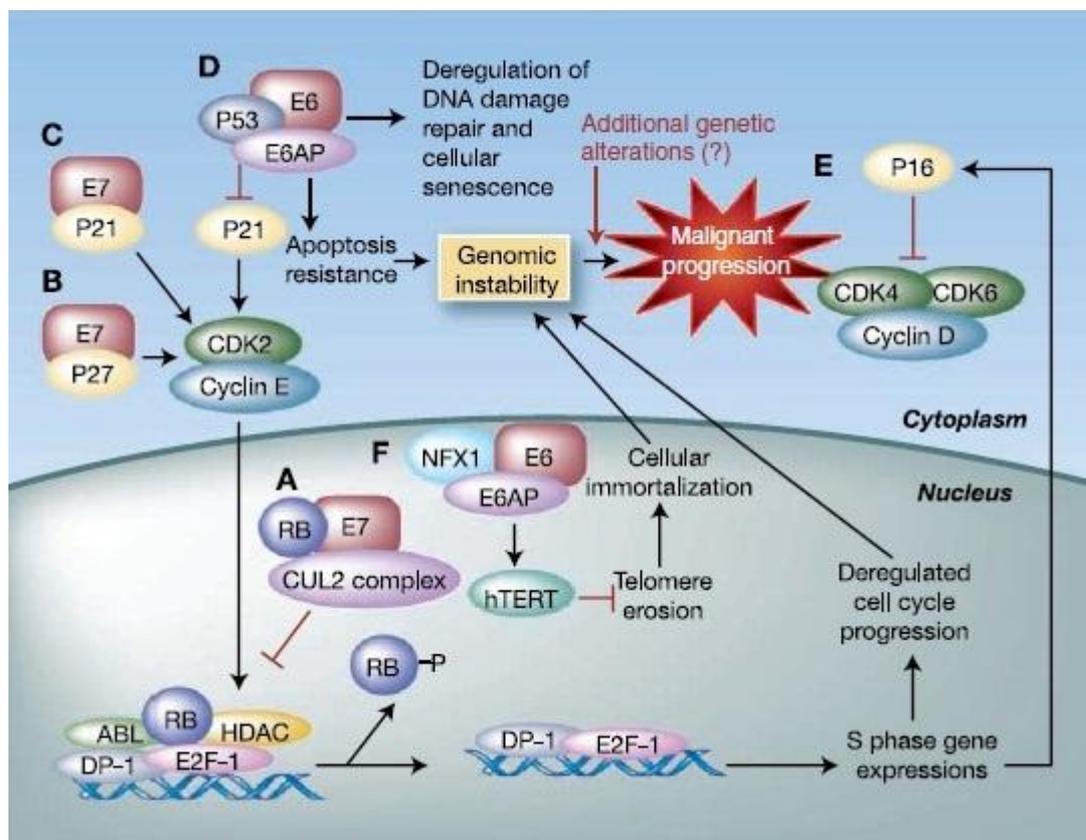
Pelo menos 15 tipos de HPVs de alto risco ou oncogênicos foram identificados, com base na associação com o carcinoma cervical, tais como os tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82. O HPV16 é o tipo mais comum, encontrado em 87% a 90% dos carcinomas de orofaringe HPV-positivos (Gillison *et al.*, 2000; Terai & Burk, 2002; Muñoz *et al.*, 2003; Kreimer *et al.*, 2005; Thavaraj *et al.*, 2011). Os HPVs de alto risco mucosos codificam três proteínas de transformação, E5, E6 e E7, cujo papel na transformação celular e manutenção do fenótipo maligno foi descrito pela primeira vez em carcinomas do colo do útero (Hwang *et al.*, 1995). A proteína E5 do HPV pode contribuir para as primeiras etapas de iniciação do câncer e para a formação do câncer. Desempenha um papel importante durante o curso inicial da infecção pela ligação ao fator de crescimento epidermal (EGF), ao receptor beta ( $\beta$ ) do fator de crescimento derivado das plaquetas e ao receptor 1 do fator estimulante de colônias, para promover a proliferação celular (Hwang *et al.*, 1995; Maufort *et al.*, 2007; Talbert-Slagle & DiMaio, 2009). Entretanto, a sequência codificadora de E5 geralmente é deletada do DNA viral episossomal durante a integração ao genoma hospedeiro na progressão maligna. Assim, a expressão de E5 é perdida no carcinoma, não sendo, portanto, necessária para a manutenção do fenótipo transformado. Por isso, os processos de progressão maligna associados ao HPV de alto risco estão centrados nas oncoproteínas E6 e E7, que são regularmente expressas em lesões associadas ao HPV e ao câncer (Schwarz *et al.*, 1985).

As marcas principais dos tumores humanos, como catalogadas por Hanahan e Weinberg (2000) em seu artigo de revisão clássico, incluem a aquisição de potencial proliferativo ilimitado, a independência do fator de crescimento, evasão de apoptose e de sensibilidade aos sinais citostáticos. Incluindo ainda a introdução de propriedades invasivas e metastáticas, e a manutenção da angiogênese. Cada uma dessas características surge como resultado de alterações genômicas (Hanahan & Weinberg, 2000). Em carcinomas associados ao HPV de alto risco, as oncoproteínas E6 e E7 constituem os reguladores de cada um destes processos e, portanto, a

expressão de oncoproteínas do HPV de alto risco é representativa para múltiplos processos oncogênicos. Esse processo é normalmente relacionado à mutações devido à predisposição genética e/ou à exposição ambiental a substâncias cancerígenas. Além disso, as oncoproteínas E6 e E7 atuam como potentes modificadores de mitose, aumentando assim a probabilidade de adquirir mutações celulares adicionais que contribuem para a progressão carcinogênica durante cada ciclo da divisão celular (Hurlin *et al.*, 1991).

O desenvolvimento de câncer por HPV de alto risco baseia-se na interação do vírus no genoma hospedeiro (Munger *et al.*, 2004). Este evento desregula o gene E2 do HPV, que é um repressor transcricional dos genes E6 e E7. Uma vez libertos do controle de E2, a produção de proteínas E6 e E7 interfere nas vias celulares que controlam a divisão celular, a reparação do DNA e a apoptose (Dyson *et al.*, 1989; Munger *et al.*, 1989) (**Figura 2**).

A proteína E7 do HPV se liga ao complexo ligase de ubiquitina cullin 2 (CUL2) e ubiquitina a proteína supressora de tumor do retinoblastoma, a pRb, que controla a entrada da célula na fase S do ciclo celular pela associação com membros da família de fatores de transcrição E2F, indutores da progressão do ciclo celular (Dyson *et al.*, 1989; Munger *et al.*, 1989; Hanahan & Weinberg, 2000; Huh *et al.*, 2007). A ubiquitinação induz a degradação da pRb, resultando no descontrole da fase G1/S do ciclo celular. Na ausência da função de pRb, a família E2F de fatores de transcrição é liberada e a transcrição de genes na fase S ocorre, levando à proliferação celular. Nas células normais, a fosforilação da pRb pelos complexos quinases dependentes de ciclina CDK4 e/ou CDK6/ciclinaD em G1 resulta na ruptura e/ou inativação funcional dos complexos repressores transcricionais pRb/E2F e os E2Fs dissociados atuam como ativadores transcricionais de genes que são fundamentais para a entrada na fase S e progressão (Dyson *et al.*, 1989). A proteína E7 está associada com a pRb pela sequência de aminoácidos LXCXE (L= leucina; C= cisteína; E= glutamato; X= qualquer aminoácido) (Munger *et al.*, 1989a). Portanto, a inativação de pRb libera o E2F, fator de transcrição que induz a progressão do ciclo celular. As proteínas E7 de HPVs de alto risco ligam-se à pRb de forma mais eficiente do que a E7 de HPVs de baixo risco. Essa diferença de ligação foi atribuída ao resíduo de aminoácido que precede a sequência LXCXE (Heck *et al.*, 1992.; Sang & Barbosa, 1992; Ciccolini *et al.*, 1994).



**Figura 2: Diagrama da transformação maligna nos queratinócitos causada pelas oncoproteínas E6 e E7 do HPV.** No sentido horário a partir de A: ubiquitinação por E7 e o complexo ligase de ubiquitina cullin 2 levando à degradação do pRb; B: interação entre E7 e p27 resultando na inibição da parada do ciclo celular; C: interação entre E7 e p21 resultando na inibição da parada do ciclo celular; D: ubiquitinação por E6 e ligase de ubiquitina E6AP levando à degradação de p53; E: aumento da expressão de p16 devido à ausência de função de pRb; F: degradação de NFX1, um repressor transcricional de hTERT, por associação com E6/E6AP resultando na ativação de hTERT e imortalização celular. Adaptado de Chung & Gillison, 2009.

A capacidade com que a proteína E7 do HPV de alto risco se liga à pRb para a degradação se correlaciona fortemente com a sua capacidade de transformação celular (Jones & Munger, 1997). A inativação enzimática de pRb por E7 tem duas implicações importantes. Em primeiro lugar, um mecanismo não-estequiométrico assegura a inativação eficaz da pRb mesmo quando E7 é expressa em níveis baixos. Isso pode ser necessário de modo a evitar a detecção e eliminação de células infectadas pelo sistema imune durante a infecção persistente. Em segundo lugar, a degradação da pRb mediada por E7 resulta na subversão de todas as

atividades biológicas da pRb, não apenas daquelas relacionadas à regulação do ciclo celular. Isto é muito importante devido a pRb estar envolvida na regulação de múltiplos processos celulares, incluindo morte celular, pontos de controle mitóticos e diferenciação celular (Du & Pogoriler, 2006). Assim, a inativação da pRb leva à desregulação de outros componentes do ciclo celular, como por exemplo, a p16, uma proteína inibidora do complexo quinase dependente de ciclina (CDK), que se acumula na tentativa de impedir a proliferação celular. Apesar do acúmulo de p16, a E7 supera os efeitos inibitórios por meio de outras vias e a proliferação descontrolada segue.

A proteína E6 do HPV forma um complexo com uma ligase de ubiquitina E3, a proteína associada à E6 (E6AP) e ubiquitina a proteína supressora de tumor p53. A principal função de p53 é também impedir a progressão do ciclo celular para permitir a reparação do DNA. Se a lesão ao DNA é grande, o p53 desencadeia a apoptose da célula. Devido a isso, conceituou-se a p53 como “a guardiã do genoma”, que mantém a integridade do DNA celular. A ubiquitinação provoca a degradação rápida de p53, o que resulta na desregulação de *checkpoints* do ciclo celular, levando à instabilidade genômica (Kesis *et al.*, 1993; Hanahan, Weinberg, 2000). Além disso, a E6 em conjunto com E6AP, induz a ativação da enzima telomerase (hTERT), uma transcriptase reversa, pela degradação de NFX1, um repressor de transcrição da hTERT, contribuindo assim para a imortalização da célula, com potencial de replicação ilimitado (**Figura 2**).

Estudos recentes indicam que E6 e E7 têm vários parceiros de ligação que exercem efeitos oncogênicos além da degradação da p53 e pRb, e têm efeitos complementares na atividade de transformação. Quando o pRb é eliminado *in vivo*, a perda de desse repete alguns dos fenótipos da expressão de E7, mas não todos, o que indica que E7 pode ter uma função independente do pRb, contribuindo para a tumorigênese (Strati & Lambert, 2007). Por exemplo, a proteína E7 causa a ativação aberrante da quinase dependente de ciclina 2 (CDK2), que é regulada por associação com subunidades reguladoras positivas, as ciclinas E e A, bem como de inibidores de CDKs (CKIs), mais proeminentemente o p21 e o p27. A expressão de E7 resulta na expressão desregulada das ciclinas A e E pelas vias dependentes do E2F, e também inativa as atividades inibitórias do p21 e p27 (Zerfass-Thome *et al.*, 1995; Zerfass-Thome *et al.*, 1996; Funk *et al.*, 1997; Jones *et al.*, 1997; Davies *et al.*,

1993; Helt *et al.*, 2002; He *et al.*, 2003; Nguyen & Munger, 2008; Shin *et al.*, 2009). Estes CKIs também são envolvidos na ligação de parada do ciclo celular e na diferenciação dos queratinócitos (Alani *et al.*, 1998; Di Cunto *et al.*, 1998; Missero *et al.*, 1996). Portanto, a inibição de p21 e p27 por E7 pode desempenhar um papel importante na desregulação mediada pelo HPV da diferenciação e proliferação celular, necessárias para a replicação viral e carcinogênese (Chung & Gillison, 2009) (**Figura 2**).

Quando as proteínas E6 e E7 são silenciadas em linhagens de células do câncer de orofaringe HPV-positivo utilizando pequenos RNAs de interferência (shRNAs), a expressão de p53 e pRb é restaurada. Além disso, a inibição de E6 e E7 induz a apoptose e reduz a viabilidade das células, indicando que a expressão das oncoproteínas E6 e E7 é necessária para a manutenção do tumor em carcinomas de orofaringe, como é visto nos carcinomas cervicais. Além disso, a E7 é conhecida por ser a maior oncoproteína de transformação durante as fases iniciais da carcinogênese do carcinoma de orofaringe quando comparado com a E6 que parece funcionar na fase posterior (Rampias *et al.*, 2009).

Apesar de ter múltiplos parceiros de ligação com os efeitos oncogênicos bem como permitir que as células adquiram alterações genéticas que causam instabilidade genômica, a expressão de E6 e E7 sozinha não é suficiente para causar a progressão maligna ou transformação oncogênica. Porém, atualmente eventos genéticos adicionais que são necessários para o desenvolvimento de carcinomas são desconhecidos. Também não está claro se estes eventos genéticos são comuns entre cânceres associados ao HPV específicos (por exemplo, câncer de orofaringe) ou comuns a todos os cânceres associados ao HPV (por exemplo, cervical, vulvar, vaginal, câncer anal, pênis, e de orofaringe) (McLaughlin-Drubin & Munger, 2009; Chung & Gillison, 2009).

## 2.2 DOENÇAS HUMANAS ASSOCIADAS AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

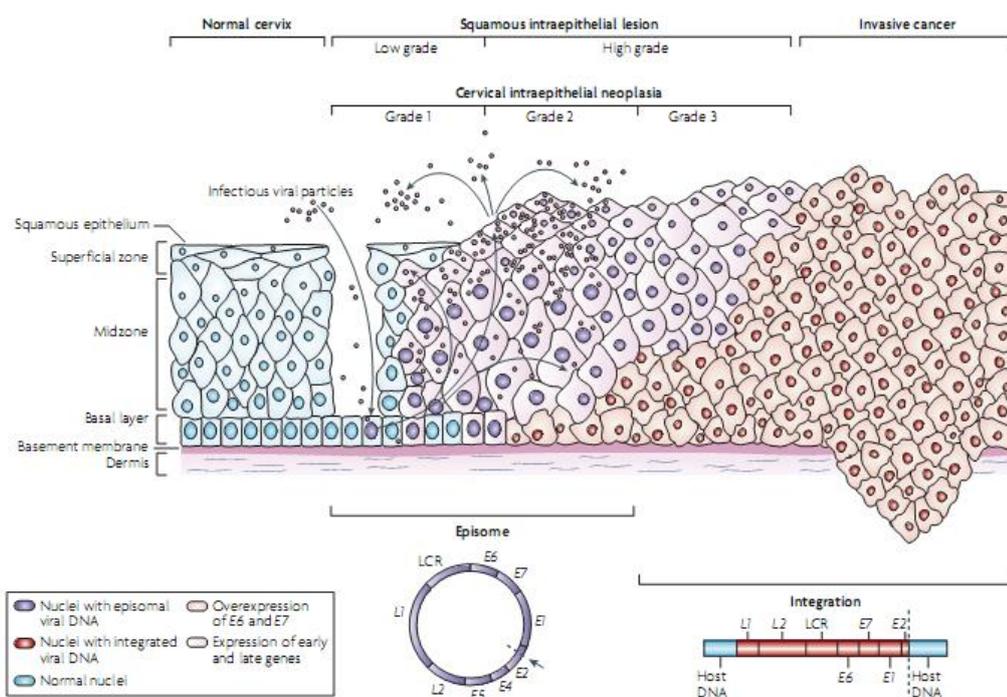
As infecções das mucosas por HPV representam um grupo de doenças sexualmente transmitidas (DST) comuns em todo o mundo. Na idade de 50 anos, cerca de 80% das mulheres foram expostas ao vírus (Myers *et al.*, 2000). Aproximadamente 630 milhões de pessoas estão atualmente infectadas por HPV no mundo, com 30 milhões de infecções genitais diagnosticadas a cada ano (Scheurer *et al.*, 2005). Além disso, estima-se que nos Estados Unidos há 20 milhões de pessoas infectadas por HPV, com quase metade delas na faixa etária de 15 a 24 anos (Cates, 1999; Koutsky, 1997; Weinstock *et al.*, 2004). O custo total estimado para o tratamento clínico de doenças associadas ao HPV nos Estados Unidos é maior que 3 bilhões de dólares por ano, e a maior parte deste montante é gasto com gestão e tratamento de lesões potencialmente malignas (Chesson *et al.*, 2004; McLaughlin-Drubin & Münger, 2009).

### 2.2.1 Doença Genital

Infecções mucosas causadas por HPV estão associadas a um elevado número de doenças, que vão desde verrugas genitais benignas até os carcinomas do colo do útero e região anogenital. Ainda que as infecções por HPV de alto risco possam causar lesões intra-epiteliais que apresentam risco de progressão maligna, a maioria das infecções por HPV de alto risco não resultam em lesões clinicamente aparentes. Uma frequência muito alta de infecções origina-se e regride espontaneamente. Além disso, a progressão maligna é geralmente um processo lento e os carcinomas associados ao HPV de alto risco surgem de anos a décadas após a infecção original. Isso proporciona uma ampla janela de oportunidades para a

detecção de lesões associadas ao HPV antes que carcinomas invasivos tenham se desenvolvido. Não obstante, a etiologia viral destes tumores favorece a prevenção e o tratamento (Frazer, 2004; McLaughlin-Drubin & Münger, 2009).

O carcinoma do colo do útero é caracterizado por uma fase pré-maligna bem definida que pode ser suspeitada pelo exame citológico de células do colo do útero esfoliadas, conhecido como Papanicolau (Pap), e confirmada por exame histológico. Estas alterações pré-malignas representam um espectro de anormalidades histológicas que variam de NIC1 (neoplasia intra-epitelial cervical com displasia leve) para NIC2 (displasia moderada) e para NIC3 (displasia severa e carcinoma *in situ*) (Woodman *et al.*, 2007), como mostra a **Figura 3**.



**Figura 3: Progressão para o câncer cervical mediada por HPV.** O HPV tem acesso às células basais através de micro-abrasões no epitélio cervical. Após a infecção, os genes iniciais do HPV, E1, E2, E4, E5, E6 e E7, são expressos e o DNA viral se replica a partir do DNA episómero (núcleo roxo). Nas camadas superiores do epitélio (zonas intermediária e superficial) o genoma viral é replicado novamente, e os genes tardios L1 e L2, e E4 são expressos. Lesões intra-epiteliais de baixo grau mantêm a replicação viral. Um número desconhecido de infecções por HPV de alto risco progride para neoplasia intra-epitelial cervical de alto grau. A progressão das lesões não tratadas para carcinoma *in situ* e invasivo está associada com a integração do genoma do HPV ao cromossomo hospedeiro (núcleo vermelho). Adaptado de Woodman *et al.*, 2007.

A progressão maligna lenta tem sido fundamental para a detecção eficiente de lesões cervicais potencialmente malignas associadas ao HPV pelo exame do Papanicolau, que consiste em um procedimento simples, bem aceito e permite a análise citológica de células esfoliativas do colo do útero. Em países onde não há programas preventivos generalizados de orientação para a coleta do exame do Papanicolau, o câncer do colo do útero é altamente prevalente e responsável por 10 a 25% dos cânceres em mulheres (Ferlay et al., 2010).

Mundialmente, o câncer do colo do útero apresenta incidência de aproximadamente 530.230 novos casos por ano e cerca de 275.000 mortes anualmente (Ferlay *et al.*, 2010, Bray *et al.*, 2012; IARC). Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA) relatam estimativa de 17.540 novos casos no Brasil, em 2012, e 4.986 óbitos em 2010. Apesar dos inúmeros programas de prevenção do Papanicolau e a consequente redução de 70% da incidência de câncer do colo do útero, este permanece sendo a segunda maior causa de morte por câncer em mulheres americanas entre 20 e 39 anos (Jemal *et al.*, 2005).

Os HPVs estão associados com mais de 99% de todos os casos de câncer do colo do útero, com os tipos de alto risco 16, 18, 31, 33 e 45 detectados em até 97% dos casos em todo o mundo (Walboomers *et al.*, 1999; zur Hausen, 2002; Clifford *et al.*, 2003; Saini *et al.*, 2010). Além do carcinoma de células escamosas, o DNA do HPV também foi detectado em adenocarcinomas cervicais, carcinomas adenoescamosos e carcinomas com diferenciação neuroendócrina (Howley & Lowy, 2007; McLaughlin-Drubin & Münger, 2009). O HPV 16 é mais comumente associado ao carcinoma de células escamosas, enquanto o HPV 18 é o tipo predominante em adenocarcinomas e carcinomas neuroendócrinos.

Uma vez que os HPVs de alto risco são sexualmente transmissíveis, a incidência de lesões e carcinomas associados ao HPV está relacionada ao início precoce da atividade sexual e ao número de parceiros sexuais durante a vida (Schiffman *et al.*, 2007). Mais de 40 tipos de HPV infectam o trato genital (de Villiers *et al.*, 2004). A maioria das mulheres é infectada depois da primeira relação sexual, com maior prevalência em mulheres abaixo dos 25 anos de idade. Depois desta idade a prevalência diminui rapidamente. Estudos transversais indicam um segundo pico da infecção em mulheres mais velhas perto do período em que a incidência do

câncer do colo do útero é mais alta (Collins *et al.*, 2002; Castle *et al.*, 2005; Franceschi *et al.*, 2006).

Os homens evidentemente desempenham um papel importante como vetores e/ou portadores de HPVs de alto risco e podem desenvolver lesões intra-epiteliais penianas. Curiosamente, essas lesões são muito menos comumente detectadas do que neoplasias intra-epiteliais em mulheres, mas podem sofrer progressão maligna para o carcinoma de pênis. Apesar dos carcinomas de pênis serem raros, em geral a taxa de incidência está relacionada com a do carcinoma do colo do útero em muitas partes do mundo (Franceschi *et al.*, 2002).

A integração das sequências do genoma do HPV ao cromossomo da célula hospedeira representa um evento frequente durante a progressão maligna. Aparentemente não há regiões no cromossomo hospedeiro para a integração do genoma do HPV, mas sítios frágeis que são alvos frequentes (Smith *et al.*, 1992).

Além da grande maioria dos carcinomas do colo do útero, uma fração de outros cânceres do trato anogenital foi relacionada à infecções por HPV de alto risco (Zur Hausen, 2002; Schiffman *et al.*, 2007; Hussain *et al.*, 2008; Acay *et al.*, 2008). Os HPVs de alto risco estão associados a 40-60% dos carcinomas vaginais, neoplasias intra-epiteliais vaginais, carcinomas penianos, até 50% dos carcinomas vulvares e aproximadamente 90% dos carcinomas anais (Parkin & Bray, 2006). Semelhantemente ao carcinoma cervical, o carcinoma anal associado ao HPV desenvolve-se na zona de transição entre os epitélios colunar e escamoso (Howley & Lowy, 2007). O risco de desenvolver infecção anal e cervico-anal é mais elevado entre os indivíduos infectados com HIV do que na população em geral (Frisch *et al.*, 2000).

### 2.2.2 Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço (HNSCC)

O HNSCC geralmente surge em indivíduos mais jovens que não têm os fatores de risco clássicos, o que torna a associação entre os carcinomas HPV-positivos independente da influência do tabaco e do álcool (Fakhry & Gillison, 2006; Pintos *et al.*, 2008; D`Souza *et al.*, 2009). Dentre os HPVs de alto risco, o tipo 16 é o mais frequentemente detectado no HNSCC, ocorrendo em 90-95% dos tumores relacionados ao HPV, seguido por uma frequência significativamente menor dos tipos 18 e 33 (Adams *et al.*, 1999; Gillison *et al.*, 2000; Venut *et al.*, 2000; Mork *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004; Schlecht *et al.*, 2007; Michl *et al.*, 2010).

O HNSCC é o sexto tipo de câncer mais comum, com uma incidência anual de aproximadamente 400.000 casos no mundo (Parkin *et al.*, 2005). No Brasil, a estimativa para o câncer de boca em 2012 é de 14.170 novos casos, sendo 9.990 homens e 4.180 mulheres. Em 2009, o número de óbitos por câncer de boca foi de 6.510, sendo 5.136 homens e 1.394 mulheres (INCA). Os HNSCCs são encontrados em cinco grandes locais anatômicos: cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe e laringe. Embora o vírus Epstein-Barr seja uma causa bem estabelecida do câncer nasofaríngeo, a associação causal entre o HPV e o câncer de orofaringe foi somente recentemente estabelecida (Gillison *et al.*, 2000; D`Souza *et al.*, 2007).

Considerando que a incidência do HNSCC não relacionada ao HPV tem se estabilizado, a incidência do carcinoma de células escamosas da orofaringe apresentou um aumento de cerca de 11% nas duas últimas décadas (Ernster *et al.*, 2007). Nos EUA, verificou-se uma diminuição na incidência de doenças malignas da orofaringe nos últimos anos, provavelmente devido à diminuição do número de fumantes relacionada às campanhas antitabagistas. No entanto, esta tendência positiva é acentuadamente compensada pelo aumento da incidência de HNSCC entre homens jovens, não fumantes e não consumidores de bebida alcoólica (Frisch *et al.*, 2000; Canto & Devesa, 2002; Shiboski *et al.*, 2005). Neste contexto, há em curso uma maior atenção para o papel do HPV no desenvolvimento de carcinomas

da orofaringe. A incidência de carcinomas relacionados ao HPV tem aumentado desde o início de 1990 nos Estados Unidos e Europa Ocidental, mas as razões para esse rápido aumento não são claras (Chaturvedi *et al.*, 2008; Näsman *et al.*, 2009). Práticas de sexo oral têm sido implicadas como um modo de transmissão (Kreimer *et al.*, 2004), porém, ao contrário do que ocorre com relação aos carcinomas cervicais, atualmente não há programas de rastreio que ajudariam na detecção de lesões precoces orais causadas por HPV. Aproximadamente 40% das pessoas com HNSCC sobrevivem cinco anos, um resultado que se manteve inalterado durante 30 anos, apesar dos avanços no tratamento e diagnóstico (Kufe *et al.*, 2003; Kupferman & Myers, 2006).

A presença do HPV é de considerável relevância clínica, uma vez que os carcinomas da orofaringe HPV-positivos estão associados a melhor prognóstico em relação aos seus homólogos HPV-negativos (Gillison *et al.*, 2000; Singhi & Westra, 2010). Comparado com carcinomas HPV-negativos de cabeça e pescoço, os carcinomas HPV-positivos têm menos alterações no número de cópias do DNA genômico, menos hipermetilação do genoma, menor frequência de mutações e menor expressão do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (Gillison *et al.*, 2000; Smeets *et al.*, 2006; Westra *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008; Richards *et al.*, 2009). Por exemplo, os tumores HPV-negativos têm perdas nos cromossomos 3p11.2-26.3, 5q11.2-35.2 e 9p21.1-24, e ganhos ou ampliações em 11q12.1-13.4, que estão ausentes em tumores HPV-positivos. Curiosamente, o cromossomo 18q12.1-23 é obtido em tumores HPV-positivos e perdido em tumores HPV-negativos (Smeets *et al.*, 2006). Nas análises da expressão de genes, as diferenças mais importantes entre tumores HPV-positivos e negativos são encontradas nas vias reguladoras do ciclo celular (Slebos *et al.*, 2006; Pyeon *et al.*, 2007).

Compreender melhor estas alterações genéticas adicionais que levam à progressão maligna é fundamental para futuras estratégias de prevenção secundária, bem como para o estabelecimento de intervenções terapêuticas objetivas para pacientes com cânceres HPV-positivos (Partridge *et al.*, 2007; Nielson *et al.*, 2007).

### 2.3 TRANSMISSÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

As lesões de mucosa decorrentes de infecção por HPV são encontradas tanto no colo do útero como na boca. A infecção pelo vírus ocorre através do contato das mucosas, principalmente durante a relação sexual. Pequenas lesões na mucosa servem como porta de entrada para o HPV, que atua na camada basal do epitélio (Vidal & Gillison, 2008). Os queratinócitos são células alvo que consistem no objetivo primário da infecção pelo Papilomavírus (Stubenrauch & Laimins, 1999). A maioria dos carcinomas de cabeça e pescoço HPV-positivos foram encontrados na região da orofaringe (em até 50% do número total de casos), o que se explica pelo percurso mais fácil de invasão do vírus na camada basal do epitélio das criptas tonsilares (McKaig *et al.*, 1998).

Diferentemente dos tumores HPV-negativos, associados ao consumo de tabaco e álcool, os tumores de cabeça e pescoço HPV-positivos são fortemente associados com o comportamento sexual, o que é consistente com os predominantes meios conhecidos de transmissão do HPV, via contato sexual (Gillison *et al.*, 2008; D'Souza *et al.*, 2009). Assim, o principal fator de risco para o carcinoma de células escamosas da orofaringe HPV-positivo é o comportamento sexual vaginal ou oral com um grande número de parceiros sexuais, bem como o início precoce da atividade sexual (Fischer *et al.*, 2010).

Uma questão fundamental na infecção oral por HPV é se ela pode desenvolver-se a partir de uma infecção genital por HPV, pelo contato orogenital ou por auto-inoculação, ou se pode ser considerada um evento independente (Nair & Pillai, 2005; Adelstein *et al.*, 2009). Pertinentes a esta questão é a frequência de infecção oral por HPV em mulheres com infecção por HPV do colo do útero. Estudos detectaram amplas estimativas de prevalência variando de 2,6% a 50%, como também produziram resultados conflitantes sobre a taxa de mulheres que apresentam o mesmo tipo de HPV nas mucosas das duas regiões, como detectado em 0 a 60% dos casos (Cañadas *et al.*, 2004; Giraldo *et al.*, 2006; Fakhry *et al.*, 2006; Rintala *et al.*, 2006; D'Souza *et al.*, 2007; Marais *et al.*, 2008; Castro *et al.*,

2009; Termine *et al.*, 2011).

Termine *et al.* (2009) encontraram uma baixa prevalência da infecção oral por HPV em mulheres com infecção por HPV do colo do útero. O HPV foi detectado em apenas dois dos 140 (1,4%) casos avaliados. Desses, o vírus foi encontrado em duas das 76 (2,6%) mulheres com infecção por HPV do colo do útero e em nenhuma das 64 mulheres não infectadas. Outros pesquisadores (Cañadas *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2004) observaram uma baixa frequência de infecção orogenital por HPV em populações de risco, sem uma correlação significativa entre a infecção oral e do colo do útero em termos de prevalência e de concordância entre os tipos de HPV nos dois locais.

Em um trabalho de D`Souza *et al.* (2007), a história natural do HPV oral foi avaliada pela coleta de amostras de bochecho oral de 136 participantes HIV-positivas e 63 participantes HIV-negativas. No estudo, observou-se que as mulheres HIV-positivas tinham mais probabilidade que as mulheres HIV-negativas para infecção oral (33% para 15%) ou do colo do útero (78% para 51%). Porém, outros três grupos de pesquisadores (Fakhry *et al.*, 2006.; Marais *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2008) relataram resultados semelhantes independentemente, sugerindo a independência da infecção por HPV nas duas regiões também em pacientes de alto risco.

Em outro estudo com uma amostra de estudantes homens universitários, D`Souza *et al.* (2009) verificaram que a taxa de desenvolvimento de infecção oral por HPV aumentou com o aumento do número de novos parceiros sexuais orais ou de parceiros de beijo na boca. Porém, não aumentou com o aumento de parceiros sexuais vaginais. Assim, nesse estudo, observou-se que o sexo oral e o beijo na boca estão associados com o desenvolvimento de infecção oral por HPV.

As diferenças nos desenhos dos estudos, como por exemplo, procedimentos de amostragem e métodos de detecção do HPV, e as características da população examinada, como população rural, acompanhamento dos cônjuges, mulheres HIV-positivas, podem ter contribuído para os conflitos e variação de intervalo entre os estudos (Lawton *et al.*, 1992; Kay *et al.*, 2002; Smith *et al.*, 2004; D`Souza *et al.*, 2005; Giovannelli *et al.*, 2006).

Uma vez que os mesmos tipos de HPV detectados no epitélio do colo do útero podem estar presentes nos queratinócitos orais, conclusões semelhantes foram retiradas da literatura ginecológica. Tem-se sugerido que as infecções genitais podem representar um reservatório de HPV e, por consequência, uma condição de predisposição para a transmissão oral (Cañadas *et al.*, 2004;. Nair & Pillai , 2005). Além disso, estudos recentes também têm mostrado que o DNA de HPV pode ser encontrado na circulação do sangue, incluindo células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), soros, plasma, e sangue da medula arterial. Ainda, o DNA de HPV detectado no sangue tem sido interpretado como tendo originado a partir de células metastáticas de câncer (Bodaghi *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2009).

## 2.4 MÉTODOS DE DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Para investigar os efeitos do HPV em tumores humanos, é fundamental a otimização dos métodos de detecção de HPV com elevadas sensibilidade e especificidade. Existem vários métodos bem estabelecidos. Embora a detecção da expressão das proteínas E6 e E7 do HPV seja o padrão ouro para classificar um tumor como HPV-positivo, a detecção de RNA viral em amostras clínicas existentes (por exemplo, tumores incluídos em parafina e fixados em formalina ou amostras citológicas aspiradas com agulha) é impraticável para diagnóstico de câncer nestas condições. Portanto, vários experimentos baseados em PCR são atualmente utilizados para detectar DNA de HPV em tumores (de Roda Husman *et al.*, 1995; Gillison *et al.*, 2000; D'Souza *et al.*, 2007; Lassen *et al.*, 2009).

De modo geral, os ensaios baseados em PCR têm maior sensibilidade com menor especificidade, devido à presença de DNA viral transcricionalmente inativo ou devido à infecção cruzada de amostras que podem causar resultados falsos-positivos (Braakhuis *et al.*, 2009). Experimentos de imuno-histoquímica comerciais capazes de detectar vários tipos de HPV de alto risco têm uma sensibilidade mais

baixa, mas podem ser utilizados para visualizar especificadamente o genoma do HPV dentro do núcleo das células tumorais (Gillison *et al.*, 2009).

Estudos têm demonstrado que o DNA isolado a partir de células epiteliais por diferentes protocolos podem ser usados com sucesso para realizar a técnica da Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Tal fato é apoiado pela alta ou completa concordância de resultados dentre ensaios baseados em PCR quando analisadas amostras de DNA isoladas de células bucais de um indivíduo. A coleta realizada por meio da técnica do raspado apresenta uma série de vantagens, dentre as quais, fácil transporte, baixo custo, facilidade de processamento e armazenamento a longo prazo, maior aceitação pelos pacientes, dado ser confortável e indolor, além de apresentar ótima qualidade do material genético obtido (Garcia-Closas *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2004).

Vários métodos de detecção de HPV baseados em PCR existem até hoje, no entanto os métodos de PCR mais comumente usados para detecção de HPV genitais têm utilizado os conjuntos de primers MY09/11 e GP5+/6+ (MY/GP) (Manos *et al.*, 1989; Evander *et al.*, 1992; de Roda Husman *et al.*, 1995; Strauss *et al.*, 2000). Estes primers têm como alvo a região conservada L1 do genoma do vírus, permitindo assim a detecção de uma ampla variedade de tipos de HPV. Esse método também permite determinar o tipo de HPV por meio do sequenciamento do produto de PCR gerado e forneceu uma maior gama de detecção de tipos de HPV em comparação aos anteriores, especialmente em amostras que foram infectadas multiplamente (Evander *et al.*, 1992; Rady *et al.*, 1995). Desde a construção do desenho dos primers MY09/11, muito mais tipos de HPVs mucosos foram descobertos.

Gravitt *et al.* (2000) conduziu o próximo passo e melhorou o conjunto de primers MY09/11 tomando em conta a sequência conservada L1 (então conhecida) para cerca de 20 tipos de HPV. Os primers PGMY09/11 consistem cada um em conjuntos oligonucleótidos que se ligam na mesma região que o conjunto de primers MY09/11 se liga, no entanto, o fato de que eles não são conjuntos de primers degenerados fornece uma medida segura de qualidade no desenho do primer. Além disso, o desenho do conjunto de primers reduziu significativamente a formação de estruturas secundárias internas dos oligonucleótidos e de resíduos internos. Ainda, o

conjunto de primers PGMY 11/09 exibiu maior sensibilidade e uma taxa mais ampla de detecção de tipos de HPV, especialmente em relação às amostras multiplamente infectadas. O conjunto de primers PGMY09/11 detectou os tipos de HPV 26, 35, 42, 45, 52, 54, 55, 59, 66 e 73 pelo menos 25% mais frequentemente do que o conjunto de primers MY09/11 (Gravitt *et al.*, 2000).

Em um estudo de Fuessel Haws *et al.* (2004), foi estabelecido o sistema nested PCR que utiliza o conjunto de primers PGMY09/11 (primeiro PCR) descrito por Gravitt *et al.* (2000), e o conjunto de primers GP5+/6+ (segundo PCR) descrito por de Roda Husman *et al.* (1995). Nesse estudo, o sistema PGMY/GP foi comparado ao nested PCR, anteriormente descrito, que utiliza a combinação de primers MY/GP. Para tal, foram utilizadas amostras cervicais e o sistema PGMY/GP detectou estatisticamente mais tipos de HPV. Os tipos adicionais de HPV detectados pelo sistema PGMY/GP incluíram os HPVs 11, 31, 54-AE9, 67, 89, e SW1. Além disso, foi capaz de detectar uma mesma cópia de HPV em uma reação de PCR. O sistema PGMY/GP forneceu amplificação específica do DNA humano mesmo na presença de baixas cargas virais, preservando ainda o tempo e diminuindo o custo financeiro (Fuessel Haws *et al.*, 2004).

Um sistema de genotipagem ideal para detecção de HPV deve ser específico para o HPV, suficientemente sensível e confiável para detectar HPV de forma consistente em amostras, ter capacidade de caracterizar completamente amostras multiplamente infectadas, e ainda ser flexível para detectar novos tipos de HPV. O sistema nested PCR PGMY/GP mostrou-se mais tipo-específico, detectando mais tipos de HPV e apresentando melhor caracterização de amostras multiplamente infectadas (Fuessel Haws *et al.*, 2004).

A alta sensibilidade do PGMY/GP permitiu a detecção de HPV em baixo número de cópias e uma maior sensibilidade ao tipo de HPV, especialmente na determinação dos tipos virais em amostras multiplamente infectadas. Assim, a padronização e o uso do sistema PGMY/GP contribuiu para a prestação de melhor tratamento e diagnóstico mais eficiente de pacientes (Fuessel Haws *et al.*, 2004).

## 2.5 VACINAS PARA O PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Atualmente, duas vacinas para o HPV são amplamente comercializadas internacionalmente. Usando a tecnologia recombinante, ambas são preparadas a partir da purificação das proteínas estruturais L1, que se juntam para formar cascas vazias tipo-específicas de HPV ou partículas semelhantes a vírus (VLPs). As vacinas contra o HPV são produzidas somente para uso profilático, portanto, elas não tratam infecções existentes ou doenças relacionadas com HPV (Ault KA, Future II Study Group, 2007). Os mecanismos pelos quais estas vacinas induzem proteção não foram completamente definidos, mas parecem envolver a imunidade celular e a neutralização de anticorpos da imunoglobulina G (IgG) (Stanley *et al.*, 2006; Olsson *et al.*, 2007).

Estão disponíveis como suspensão estéril, em frascos de vidro de uso único ou seringas pré-carregadas, mantidos entre 2°C a 8°C e não congelados. Aplicadas sob injeções intramusculares, com doses de 0,5 mL, sendo três doses para cada vacina (Merk USA, 2008).

A vacina quadrivalente foi licenciada em 2006 e contém VLPs para os tipos de HPV 6, 11, 16 e 18. É produzida usando substrato de levedura e inclui sulfato de hidroxifosfato de alumínio (ASO4) amorfo como adjuvante. Cada dose de 0,5 mL da vacina contém 20 mg de proteína L1 do HPV 6, 40 mg de proteína L1 do HPV 11 L1, 40 mg de proteína L1 do HPV-16 e 20 mg de proteína L1 do HPV 18, adsorvidos em 225 mg de adjuvante. A formulação não contém antibióticos, timerosal ou outros conservantes.

A segunda dose da vacina quadrivalente é aplicada após dois meses da primeira dose, e a terceira após seis meses da segunda dose. Foi licenciada para uso em mulheres jovens-adolescentes (com 9 anos de idade em alguns países) para prevenção de pré-cânceres e cânceres cervicais, e verrugas anogenitais. Além disso, a vacina quadrivalente está licenciada para a prevenção de lesões pré-cancerosas e cânceres vulvares e vaginais em mulheres. Em alguns países, a vacina também é licenciada para a prevenção de verrugas anogenitais em homens

(WHO, 2009).

A vacina bivalente foi licenciada em 2007 e contém VLPs do HPV dos tipos 16 e 18. É produzida usando um novo sistema de expressão de baculovírus em células de *Trichoplusia ni*. Cada dose de 0,5 mL da vacina contém 20 mg de proteína L1 do HPV 16 e 20 mg de proteína L1 do HPV 18, adsorvidos em um sistema adjuvante ASO4 contendo 500 mg de hidróxido de alumínio e 50 mg de 3-O-dexacil-40-monofosforil-lípido A.

A segunda dose da vacina bivalente é aplicada um mês após a aplicação da primeira dose, e a terceira dose após seis meses da segunda dose. Não contém timerosal, antibióticos ou outros conservantes, e foi licenciada para uso em mulheres jovens de 10 anos de idade para prevenir lesões pré-cancerosas e cânceres cervicais. Inicialmente, registros de indicações para homens não foram pedidos (WHO, 2009).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a presença do HPV na região de orofaringe de pacientes com neoplasia intra-epitelial escamosa de alto grau (NIC2 e NIC3) e carcinoma de células escamosas invasivo do colo do útero, acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília (HUB) e de seus companheiros.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Verificar a presença do HPV em orofaringe de pacientes com neoplasia intra-epitelial escamosa de alto grau (NIC2 e NIC3) e carcinoma invasivo do colo do útero, e de seus companheiros, parceiros sexuais atuais.
- 2) Identificar a frequência de lesões de cabeça e pescoço associadas ao HPV em pacientes com neoplasia intra-epitelial escamosa de alto grau (NIC2 e NIC3) e carcinoma invasivo do colo do útero, bem como em seus companheiros.
- 3) Avaliar a técnica de raspado como método de coleta de material biológico quanto ao rendimento, pureza e qualidade do DNA obtido, bem como sua utilidade para detecção do HPV.

- 4) Avaliar os fatores de risco relacionados a neoplasias intra-epiteliais e carcinoma invasivo do colo do útero, em relação à transmissão orogenital.
  
- 5) Levantar o perfil clínico e sociocomportamental de pacientes com neoplasia intra-epitelial escamosa de alto grau (NIC2 e NIC3) e carcinoma invasivo do colo do útero, acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília (HUB), e de seus companheiros.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRA DO ESTUDO

O presente estudo envolveu 70 pacientes diagnosticadas com neoplasia intra-epitelial escamosa de alto grau (NIC2 e NIC3) e carcinoma de células escamosas invasivo do colo do útero, e 30 dos seus companheiros. Foi considerado companheiro a pessoa do sexo masculino que habitasse sob o mesmo teto como cônjuge, que fosse pai do último filho, ou que estivesse namorando a paciente e que obrigatoriamente atendesse a um desses quesitos no período do exame clínico bucal. Todas as pacientes eram acompanhadas na Divisão de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário de Brasília da Universidade de Brasília (DGO-HUB-UnB) entre os anos 2007 e 2012, período o qual receberam o diagnóstico da doença do colo do útero. Portanto, as pacientes eram atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS). A realização desta pesquisa ocorreu entre março de 2011 e setembro de 2012.

O diagnóstico da doença do colo do útero foi obtido por meio do exame citológico de Papanicolau, que consiste na coleta de material biológico do colo uterino com espátula especial e em seguida este material é colocado em uma lâmina para posterior análise ao microscópio. Após esse exame inicial de triagem, o diagnóstico foi confirmado pelo exame de colposcopia, que utiliza um tipo de microscópio de campo estereoscópico, denominado colposcópico. Este amplia a imagem visualizada do colo uterino para avaliação das características do epitélio depois da aplicação sucessiva de solução salina isotônica, solução de ácido acético de 3% a 5% e solução de Lugol.

Os pacientes da amostra que eram procedentes da região centro-oeste brasileira, com idade média de 35 anos e intervalo de 22 a 60 anos, foram encaminhados à Divisão de Odontologia do HUB (DO-HUB) para a realização de exame clínico e coleta de material biológico para verificar a presença do HPV em

orofaringe. Não houve critérios de inclusão por idade. As pacientes foram selecionadas a partir da análise do diagnóstico de todas as biópsias de colo do útero realizadas na DGO/HUB entre 2007 e 2012, que fossem de neoplasia intra-epitelial de alto grau e carcinoma invasivo. Para o agendamento do exame odontológico, a paciente era perguntada se tinha um companheiro de acordo com os critérios relacionados anteriormente. Conforme resposta positiva das mulheres que tivessem, o companheiro também era convidado a participar do estudo. Assim, aqueles que aceitaram foram marcados para o exame juntamente com a paciente. Um companheiro atendido foi excluído da pesquisa por ser do sexo feminino e, portanto, não estar de acordo com os critérios de inclusão pré-estabelecidos.

Conforme prevalência das lesões mencionadas do colo do útero acima, foram envolvidos 100 pacientes neste estudo. Todos formalizaram sua intenção de participação no estudo através da assinatura de termo de consentimento informado, apresentado no **Anexo A**.

## 4.2 EXAME CLÍNICO

O exame clínico foi realizado na Divisão de Odontologia do HUB. Durante o mesmo, as pacientes e seus companheiros tiveram sua face, cavidade oral e orofaringe examinadas, para verificar a presença de lesões relacionadas ao HPV e de lesões bucais causadas por outros agentes etiológicos. Quando detectadas, os pacientes eram encaminhados para tratamento na própria Divisão de Odontologia. Para o exame bucal, utilizou-se um refletor com luz artificial, com o paciente sentado na cadeira (equipo) odontológica.

O exame físico extrabucal compreendeu a inspeção da face quanto à cor, volume e simetria, manobras na articulação temporo-mandibular (ATM) e palpação dos linfonodos, glândulas salivares e músculos mastigatórios. No exame físico intrabucal, avaliou-se as regiões de mucosa gengival, jugal, labial, palato, assoalho

lingual, orofaringe e língua, por meio de inspeção e palpação. Todos os achados foram notificados em prontuário clínico individual para cada paciente.

Associado ao exame clínico, os pacientes responderam a um questionário sobre a história médica pregressa de lesões benignas como verrugas e papilomas ou carcinomas, associados etiologicamente ao HPV, como o câncer da região de cabeça e pescoço, e da região anogenital (vagina, vulva, pênis, reto e ânus). Questionou-se também sobre a história da doença atual do colo do útero, como há quanto tempo (em meses e anos) recebeu o diagnóstico, idade no período do diagnóstico, tratamento realizado e frequência atual das consultas de acompanhamento. Levantou-se ainda a relação com os fatores de risco associados à lesão do colo do útero e à transmissão orogenital do HPV. Esses fatores consistiram no número de casamentos e de parceiros sexuais durante a vida, se os filhos são do mesmo pai, idade com a qual começou a ter relação sexual, se faz uso de métodos preservativos como camisinha, frequência de sexo vaginal (quantos dias na semana), e se faz sexo oral e com qual frequência (quantos dias na semana).

Além das questões acima mencionadas, os pacientes também foram perguntados sobre a história presente ou passada de consumo de cigarro, bebida alcoólica e drogas. Ainda responderam questões sobre a saúde geral, como doenças cardiológicas, respiratórias, articulares, imunológicas e infectocontagiosas, se faz uso de medicamentos, história de alergias e de distúrbios sanguíneos, tais como anemia e hemorragia.

A fim de auxiliar na identificação e no traçado do perfil social dos pacientes atendidos, coletamos também dados como raça, endereço (se residente em Brasília ou cidade satélite e entorno do Distrito Federal-DF) e ocupação trabalhista.

Os prontuários clínicos das mulheres e dos companheiros estão explicitados nos **Anexos B e C**, respectivamente.

### 4.3 COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras de material biológico foram coletadas após o exame clínico por meio de raspado, utilizando um kit com uma escova citológica estéril e um tubo com 1 mL de meio para armazenamento e transporte da amostra (Digene Corporation, USA). A técnica de coleta compreendeu 10 movimentos completos de vaivém na região de mucosa orofaríngea – especificamente as áreas de base de língua e tonsilar - em cada lado da boca, como mostra a **Figura 4**. Posteriormente, a escova citológica foi imersa em tubo próprio contendo meio líquido específico para preservação e misturadas várias vezes por inversão. Foi recomendado que os pacientes escovassem os dentes anteriormente ao exame.



**Figura 4:** Método de coleta do raspado na região de mucosa de orofaringe com escova citológica.

O material biológico coletado foi encaminhado para o Laboratório de Histopatologia Bucal do Departamento de Odontologia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (FS-UnB) e armazenado em congelador à temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  até o momento dos procedimentos laboratoriais de extração do DNA, aproximadamente seis meses após a coleta das amostras.

#### 4.4 EXTRAÇÃO DE DNA

Inicialmente, cada amostra de material biológico foi submetida à lise pela exposição por período de sete dias, à  $300\ \mu\text{L}$  de solução de lise do Kit comercial para extração de DNA (Gentra Puregene Buccal Cell Kit, Qiagen, DE). Após tal período, procedeu-se a extração de DNA, segundo instruções específicas do fabricante.

Primeiramente, as amostras foram misturadas em vortex por 10 segundos e incubadas em banho-maria a  $65^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Para obtenção do máximo rendimento do material genético, foram adicionados  $1,5\ \mu\text{L}$  de Puregene Proteinase K e novamente as amostras foram incubadas em banho-maria a  $55^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. Após esta segunda incubação, foram acrescentados  $1,5\ \mu\text{L}$  de solução RNase A e novamente incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, para obtenção de DNA livre de RNA. Depois disso, as amostras foram incubadas por 1 minuto no congelador para rápido esfriamento e em seguida adicionou-se  $100\ \mu\text{L}$  de solução de precipitação proteica, sendo depois passadas no vortex por 20 segundos em alta velocidade. Em seguida, foram novamente incubadas no congelador por 5 minutos. Após incubação, as amostras foram centrifugadas por 3 minutos em  $14.000$  rotações por minuto (rpm), formando um pellet denso.

Em outros tubos de microcentrífuga de  $1,5\ \text{mL}$  para cada amostra, foram colocados  $300\ \mu\text{L}$  de isopropanol e  $0,5\ \mu\text{L}$  de solução glicogênica, e então, cuidadosamente, foi adicionado o sobrenadante da etapa anterior. As amostras

foram misturadas e centrifugadas por 5 minutos em 14.000 rpm. Logo após, o sobrenadante foi desprezado e ao pellet de DNA precipitado foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  de etanol a 70%. Novamente, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram colocadas para secar ao ar por 5 minutos. Depois disso, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução de hidratação de DNA e as amostras foram passadas no vortex por 5 segundos para misturar. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 65°C por 1 hora para dissolver o DNA, terminando assim a etapa de extração do DNA.

O DNA purificado foi mantido à temperatura de -20°C, até a realização da quantificação e do PCR.

#### 4.5 QUANTIFICAÇÃO, PUREZA E RENDIMENTO DO DNA

A avaliação quantitativa do DNA coletado foi realizada pelo método de análise óptica de espectrofotometria (Espectrofotômetro UV-1601, Shimadzu Corporation, JP). Procedeu-se a leitura da absorbância (A), que consiste na quantidade de luz absorvida ao atravessar as moléculas de DNA, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. Para tal, foram diluídos 4  $\mu\text{L}$  de cada amostra (soluto) em 196  $\mu\text{L}$  de tampão solvente (Tampão TE: Tris 10 mM, etilenodiamino tetra-acético – EDTA 1 mM, pH 8,0).

Aferidos os valores da absorbância, foi avaliada a pureza do DNA pelo cálculo da razão entre as leituras  $A_{260}/A_{280}$ , sendo desejado um valor próximo entre 1,5  $\mu\text{g}$  e 2,0  $\mu\text{g}$ . Também foi analisado o rendimento do DNA, obtido pelo cálculo da concentração ([ ]) de DNA de cada amostra, conforme a fórmula a seguir.

$$[\mu\text{g}/\mu\text{L}] = \frac{\text{Absorbância a } 260\text{nm} \times \text{Fator de diluição} \times 50}{1.000}$$

Nessa fórmula, o fator de diluição, equivalente à 50, corresponde à proporção de diluição da amostra com o tampão TE (1:50) e considerando que uma unidade a 260 nm corresponde a 50 µg/mL de DNA (densidade óptica - DO = 50 µg/mL de DNA), a leitura da A<sub>260</sub> é multiplicada por 50 µg/mL.

Desta forma, pela análise espectrofotométrica, determinou-se a quantidade, o grau de pureza e o rendimento do DNA em cada amostra de DNA do material coletado.

#### 4.6 QUALIDADE DO DNA

Todas as amostras foram analisadas quanto à qualidade do DNA utilizando o padrão de amplificação do gene da proteína beta-globina (β-globina) por meio da técnica de Reação em Cadeia de Polimerase, como descrito por Saiki *et al.* (1988). Para tal, foi utilizado o conjunto de iniciadores (primers) Forward (F) e Reverse (R) (Integrated DNA Technologies, USA), no volume de 1,25 µL de cada primer, juntamente com 12,5 µL de solução Master Mix (PCR Master Mix 2x, Fermentas Life Sciences, CAN), 5 µL de água (Water Nuclease-Free, Fermentas Life Sciences, CAN) e 5 µL da amostra de DNA, para cada caso. Um tubo contendo a mistura, sem amostra de DNA, foi utilizado como controle negativo, preparado no mesmo momento e sob as mesmas condições de reação das amostras dos pacientes. Na **Tabela 1** estão apresentadas as sequências dos primers e o tamanho do fragmento em pares de base (bp) esperado após amplificação.

**Tabela 1** – Diagrama do PCR para a beta-globina, utilizando as sequências gênicas do conjunto de primers Forward (F) e Reverse (R)

Gene	Sequência (5' - 3')	Tamanho (bp*)
	F- AGGTACGGCTGTCATCACTT	
<b>β-globina</b>		268
	R- CCTCACCACTTCATCC	

\*bp: pares de base.

O PCR foi realizado em aparelho termociclador (Peltier Thermal Cycler, Nova Instruments, USA) e em seguida, o produto do PCR foi corrido em gel de agarose a 2% e avaliadas no aparelho foto-documentador de géis.

#### 4.7 DETECÇÃO DO HPV

A detecção do HPV foi realizada por meio da técnica de nested PCR descrita por Fuessel Haws *et al.* (2004). Tal procedimento consistiu na utilização de um conjunto de primers PGMY09/11 (primeiro PCR) descrito por Gravitt *et al.* (2000), e um conjunto de primers GP5+/6+ (segundo PCR) descrito por de Roda Husman *et al.* (1995), que amplificam a sequência gênica conservada L1 do genoma do HPV. O sistema PGMY/GP detecta os tipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 54, 54-AE9, 58, 61, 62, 66, 67, 70, 71, 72, 85, 89 e SW1. Os tipos de HPV 11, 31, 54-AE9, 67, 89, e SW1, até então não tinham sido detectados por técnicas anteriores. Além disso, o sistema PGMY/GP permite a detecção de HPV em baixo número de cópias e possui maior sensibilidade aos diferentes tipos de HPV, especialmente na determinação de tipos virais em amostras multiplamente infectadas (Fuessel Haws *et al.*, 2004).

Para a realização do primeiro PCR, utilizou-se uma mistura com 8,9 µL de água (Water Nuclease-Free, Fermentas Life Sciences, CAN), 2,5 µL de tampão Taq

(10x Taq Buffer with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Fermentas Life Sciences, CAN), 1,0 µL de solução de cloreto de magnésio (25 mM MgCl<sub>2</sub>, Fermentas Life Sciences, CAN), 0,2 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), 0,4 µL de cada um dos 18 primers contidos no conjunto PGMY09/11 (total de 7,2 µL), 0,2 µL da enzima taq polimerase (Taq DNA Polimerase, Invitrogen, USA) e 5,0 µL de DNA, para cada caso, somando-se um volume final de 25 µL. Um tubo contendo a mistura, sem amostra de DNA, foi utilizado como controle negativo. O primeiro PCR consistiu em 40 ciclos. As sequências gênicas dos primers PGMY09/11 estão listadas na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Tabela com as sequências gênicas dos primers PGMY09/11 utilizados no primeiro PCR para verificação da presença de HPV pela amplificação da sequência gênica conservada L1

Região gênica	Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho (bp*)
<b>L1 (HPV)</b>	PGMY11A	GCACAGGGACATAACAATGG	<b>450</b>
	PGMY11B	GCGCAGGGCCACAATAATGG	
	PGMY11C	GCACAGGGACATAATAATGG	
	PGMY11D	GCCCAGGGCCACAACAATGG	
	PGMY11E	GCTCAGGGTTTAAACAATGG	
	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	

\*bp: pares de base

No procedimento do segundo PCR, utilizou-se uma mistura contendo 8,2 µL de (Water Nuclease-Free, Fermentas Life Sciences, CAN), 2,5 µL de tampão Taq (10x Taq Buffer with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, Fermentas Life Sciences, CAN), 3,0 µL de solução de cloreto de magnésio (25 mM MgCl<sub>2</sub>, Fermentas Life Sciences, CAN), 1,0 µL de desoxirribonucleotídeos fosfatados (dNTPs), 2,5 µL de primers GP5+, 2,5 µL de primers GP6+, 0,3 µL da enzima Taq Polimerase e 5,0 µL de produtos do primeiro PCR com PGMY09/11, para cada caso. Essa mistura resultou em um volume final de 25 µL. Novamente, um tubo contendo a mistura, sem amostra de DNA, foi utilizado como controle negativo. Todas as amostras de controle foram preparadas e analisadas em paralelo com as amostras clínicas para assegurar que as condições corretas de reação foram mantidas. Este segundo PCR consistiu em 40 ciclos. Na **Tabela 3** encontram-se listados os primers GP5+/6+ com suas sequências gênicas.

**Tabela 3** – Tabela com as sequências gênicas dos primers GP5+/6+ utilizados no PCR secundário para verificação da presença de HPV pela amplificação da sequência gênica conservada L1

Região gênica	Primer	Sequência (5` - 3`)	Tamanho (bp*)
<b>L1 (HPV)</b>	GP5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC	150
	GP6+	GAAAATAAACTGTAAATCATATTC	

\*bp: pares de base

As duas etapas do nested PCR foram realizadas no mesmo aparelho termociclador de DNA (Peltier Thermal Cycler, Nova Instruments, USA) usado para o PCR da análise qualitativa do DNA, e em seguida, as amostras foram corridas em gel de agarose a 2% e avaliadas no aparelho foto-documentador de géis.

#### 4.8 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos do PCR de cada amostra, tanto os obtidos pela avaliação qualitativa por meio da amplificação do gene da proteína beta-globina, como os obtidos pela amplificação da sequência gênica L1 do HPV, foram corridos em gel de agarose a 2% pela técnica de eletroforese. Esta consiste na separação de moléculas pela migração de partículas corridas em gel durante a aplicação de uma diferença de potencial elétrico. As moléculas são separadas de acordo com o seu tamanho, devido às moléculas de menor massa migrarem mais rapidamente que as de maior massa.

Essa metodologia utiliza a agarose como gel para a eletroforese. A agarose é um polissacarídeo e forma uma rede que prende as moléculas do DNA durante a migração. Dependendo da concentração de agarose, há uma diferença no gradiente de separação, e para as amostras deste estudo, foi utilizada a agarose na concentração de 2%.

Para preparação do gel de agarose foi misturado o pó de agarose à 2% com a solução tampão tris-acetato-EDTA (TAE 1x). Esta mistura foi fundida e então foi acrescentado brometo de etídio (EtBr), substância intercalante que revela os ácidos nucléicos do DNA ao fluorescer sob luz ultravioleta (UV). Na presença de menores temperaturas o gel ganha consistência.

Os rastros ou bandas de DNA formadas no gel foram em seguida avaliados e comparados em um aparelho foto-documentador de géis (Multimage Light Cabinet Filter Positions, Alpha Innotech Corporation, USA), que utiliza luz UV para visualização das bandas. O aparecimento ou a ausência de bandas confirmou a presença ou não das sequências de DNA que se objetivou ampliar por PCR, detectar e analisar.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a proposição deste estudo, efetuou-se uma análise descritiva quanto à prevalência do HPV na região de orofaringe das mulheres com lesões do colo do útero induzidas por HPV, bem como dos seus parceiros sexuais. Além disso, por meio do programa estatístico SigmaStat 3.1 para ambiente Windows (Systat, Illinois, USA), avaliou-se a associação entre a infecção oral por HPV e as variáveis de risco usando como medida de associação a razão de chances (Odds ratio) e seus intervalos de confiança de 95%.

As variáveis de risco para as mulheres incluíram: idade no período de diagnóstico da doença do colo do útero, outra doença relacionada ao HPV, filhos do mesmo pai, número de casamentos, idade do início de relações sexuais, número de parceiros sexuais, uso de camisinha, frequência de sexo vaginal por semana, frequência de sexo oral por semana e soropositividade para HIV. As variáveis de risco para os companheiros compreenderam: doença associada ao HPV, filhos da mesma mãe, número de casamentos, idade do início de relações sexuais, número de parceiras sexuais, uso de camisinha, doença sexualmente transmissível, frequência de sexo vaginal por semana, frequência de sexo oral por semana.

Analizou-se também a frequência do HPV em orofaringe da amostra avaliada. A significância estatística da mesma foi determinada pelo Teste Exato de Fisher ao nível de 5%.

Conforme prevalência das lesões mencionadas do colo do útero na DGO-HUB, foram envolvidos 100 pacientes neste estudo, o qual foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília, Registro Nº 106/10, mostrado no **Anexo D**.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EXAME CLÍNICO

A história médica dos pacientes revelou que 16 (11 mulheres e 5 homens) eram portadores de doença cardíaca. Duas mulheres eram soropositivas para HIV. Uma paciente tinha diabetes e uma era portadora de lúpus eritematoso sistêmico. Além disso, três mulheres estavam grávidas no período do exame clínico e três relataram já terem realizado transfusão sanguínea (**Tabela 4**).

**Tabela 4** – Achados sistêmicos da história médica das mulheres lesão do colo do útero e parceiros – 70 mulheres e 30 homens

<b>Achado Sistêmico</b>	<b>Mulheres</b>	<b>Homens</b>
<b>Doença cardíaca</b>	11	5
<b>HIV positivo</b>	2	–
<b>Diabetes</b>	1	–
<b>Lúpus Eritematoso Sistêmico</b>	1	–
<b>Gravidez</b>	3	–
<b>Transfusão de sangue</b>	3	–

Ao exame físico extrabucal observou-se que dois homens e cinco mulheres apresentaram estalido da ATM à abertura bucal, e dois homens e três mulheres relataram sentir dor à abertura bucal. Em um homem e sete mulheres verificou-se leve desvio da ATM à abertura, além de um homem e uma mulher apresentarem linfonodos palpáveis, sugestivos de processo inflamatório de cabeça e pescoço (**Tabela 5**).

Ao exame físico intrabucal, constatou-se a presença de torus palatino e mandibular em dois homens e três mulheres. A presença de candidíase foi detectada em dois homens e oito mulheres usuários de prótese total. Úlceras,

sugestivas de aftas recorrentes em um homem e três mulheres. Também foram diagnosticadas lesões brancas sugestivas de líquen plano em uma mulher e leucoplasia em um homem fumante. Fibroma traumático em dois homens. Um total de 19 pessoas apresentou pigmentação melânica na pele facial e/ou na mucosa bucal, detectadas em três homens e dezesseis mulheres (**Tabela 5**).

**Tabela 5** – Achados clínicos ao exame extrabucal e intrabucal das mulheres com lesão do colo do útero e parceiros – 70 mulheres e 30 homens

<b>Achado</b>	<b>Mulheres</b>	<b>Homens</b>
<b>Estalido da ATM à abertura bucal</b>	5	2
<b>Dor à abertura bucal</b>	3	2
<b>Desvio da ATM à abertura bucal</b>	7	1
<b>Linfonodos palpáveis</b>	1	1
<b>Torus</b>	3	2
<b>Candidíase</b>	8	2
<b>Aftas recorrentes</b>	3	1
<b>Líquen plano</b>	1	–
<b>Leucoplasia</b>	–	1
<b>Fibroma traumático</b>	–	2
<b>Pigmentação melânica</b>	16	3

O exame intrabucal não revelou a presença de lesões clinicamente sugestivas de HPV nos 100 pacientes examinados.

Todas as anormalidades encontradas e relatadas acima foram tratadas, em caso de indicação de tratamento, na Divisão de Odontologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB), pelos profissionais da área de Diagnóstico Bucal do curso de Odontologia da Universidade de Brasília (UnB).

## 5.2 ANÁLISE DO PERFIL SOCIOCOMPORTAMENTAL DA AMOSTRA

### 5.2.1 Mulheres

As características do perfil sociocomportamental das pacientes participantes do estudo com neoplasia intra-epitelial de alto grau e carcinoma de células escamosas invasivo do colo do útero, atendidas no Centro de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital Universitário de Brasília, estão relacionadas na **Tabela 6**.

Constatou-se que a maioria das pacientes examinadas (55/70) possui idade superior a 30 anos, apresentando um percentual de 78,6%. Um total de 45 das 70 mulheres (50,1%) apresenta cor da pele parda, seguida da cor branca com 32,8% (23/70), com apenas 17,1% (12/70) das mulheres tinham cor da pele negra. Além disso, uma expressiva maioria das mulheres, com 95,7% (67/70), reside em cidades satélites e região do entorno do Distrito Federal, com apenas três mulheres residentes em Brasília, as quais exercem função de empregadas domésticas e moram em casa de patrões. Ressaltando que as pacientes do presente estudo eram atendidas pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Com relação à ocupação trabalhista, 30% (21/70) são trabalhadoras do lar, 14,3% (10/70) são empregadas domésticas, 5,7% (4/70) são funcionárias públicas, 20% (14/70) são profissionais liberais e 30% (21/70) exercem outras funções, como empregadas do setor privado. A maioria das pacientes (42/70) foi diagnosticada com a doença do colo do útero há um ano ou menos do período da consulta clínica odontológica, enquanto as outras 28 receberam diagnóstico há mais de um ano. Quanto ao tratamento ginecológico ou oncológico recebido, 56 fizeram conização, 10 pacientes fizeram quimioterapia, histerectomia ou radioterapia, e oito ainda não haviam recebido tratamento por terem obtido diagnóstico recentemente à consulta. Dentre todas, 37 pacientes estavam sendo acompanhadas com consultas mensais, bimestrais ou trimestrais, e 31 tinham consultas com frequência maior que de três

em três meses. Duas pacientes só haviam sido diagnosticadas até o momento e iriam começar o tratamento.

Trinta e nove pacientes relataram ter até dois filhos e 31 tinham mais de dois filhos. Quando perguntadas se algum dos filhos já foi diagnosticado com HPV, 67 mulheres responderam que não e apenas duas confirmaram a infecção de algum dos filhos pelo vírus. Uma paciente da amostra não tinha filhos. Com relação ao consumo de cigarros, 40 pacientes disseram nunca ter fumado, 16 foram fumantes, mas que pararam de fumar e 14 eram fumantes ativos. Quanto ao consumo de bebidas alcoólicas: 25 nunca beberam, 24 consumiram, mas haviam parado e 21 relataram consumir bebida alcoólica atualmente. Por último, perguntadas sobre o consumo de drogas, a maioria expressiva de 65 pacientes afirmaram nunca ter usado, quatro disseram ter usado, mas não mais no momento e somente uma relatou usar drogas atualmente (**Tabela 6**).

### 5.2.2 Parceiros

O perfil sociocomportamental da amostra masculina, constituída por parceiros sexuais atuais das pacientes avaliadas está apresentado na **Tabela 7**.

A maioria dos parceiros, 21, tinham idade superior a 30 anos, e os nove demais tinham idade inferior ou igual a 30 anos. Um total de 17 parceiros apresentava cor da pele parda, sete pertenciam à raça branca e seis eram negros. Todos os 30 pacientes residiam em cidades satélites ou entorno do Distrito Federal, dentre os quais 20 tinham até dois filhos e 10 mais de dois filhos. Nenhum paciente relatou ter tido câncer em qualquer região do corpo. Metade deles, 15, confirmou nunca ter fumado na vida, enquanto 10 fumaram há algum tempo, mas pararam, e cinco são fumantes ativos. Apenas três relataram nunca ter consumido bebida alcoólica, 14 consumiram, mas não mais atualmente e 13 consomem até então.

Mais da metade, 20, disseram nunca ter feito uso de drogas e 10 usaram, mas pararam (**Tabela 7**).

**Tabela 6** - Perfil sociocomportamental das pacientes participantes do estudo – n=70

<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Idade</b>		
≤ 30	15	21,4
> 30	55	78,6
<b>Cor da pele</b>		
Branca	23	32,8
Negra	12	17,1
Parda	45	50,1
<b>Habitação</b>		
Brasília	3	4,3
Cidade satélite e entorno	67	95,7
<b>Ocupação</b>		
Do lar	21	30
Doméstica	10	14,3
Funcionária Pública	4	5,7
Profissional Liberal	14	20
Outros	21	30
<b>Tempo de diagnóstico</b>		
≤ 1 ano	42	60
> 1 ano	28	40
<b>Tratamento realizado</b>		
Conização	56	80
Outros	10	14,3
Sem tratamento	8	11,4
<b>Acompanhamento</b>		
≤ 3 meses	37	52,8
> 3 meses	31	44,3
<b>Número de filhos</b>		
≤ 2	39	55,7
> 2	31	44,3
<b>Filhos HPV-positivos</b>		
Sim	2	2,8
Não	67	95,7
<b>Fumante</b>		
Ativo	14	20
Inativo	16	22,9
Nunca	40	57,1
<b>Consumo de bebida alcoólica</b>		
Ativo	21	30
Inativo	24	34,3
Nunca	25	35,7
<b>Consumo de drogas</b>		
Ativo	1	1,4
Inativo	4	5,7
Nunca	65	92,9

Tabela 7 - Perfil sociocomportamental dos parceiros sexuais atuais das pacientes – n=30

<b>Variável</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Idade</b>		
≤ 30	9	30
> 30	21	70
<b>Cor da pele</b>		
Branca	7	23,3
Negra	6	20
Parda	17	56,7
<b>Habitação</b>		
Brasília	0	0
Cidade satélite e entorno	30	100
<b>Número de filhos</b>		
≤ 2	20	66,7
> 2	10	33,3
<b>Câncer</b>		
Sim, em região de cabeça e pescoço	0	0
Sim, em outro local	0	0
Não	30	100
<b>Fumante</b>		
Ativo	5	16,7
Inativo	10	33,3
Nunca	15	50
<b>Consumo de bebida alcoólica</b>		
Ativo	13	43,3
Inativo	14	46,7
Nunca	3	10
<b>Consumo de drogas</b>		
Ativo	0	0
Inativo	10	33,3
Nunca	20	66,7

### 5.3 ANÁLISE DA QUANTIFICAÇÃO, PUREZA E RENDIMENTO DO DNA

A avaliação da quantidade de DNA das amostras, obtida por meio da análise de espectrofotometria óptica, apresentou valores de densidade óptica a 260 nm que variaram entre 0,003  $\mu\text{g}$  e 0,141  $\mu\text{g}$ , com média de 0,0316  $\mu\text{g}$  e valores a 280 nm variando entre 0,001  $\mu\text{g}$  e 0,138  $\mu\text{g}$ , com média de 0,0276  $\mu\text{g}$ .

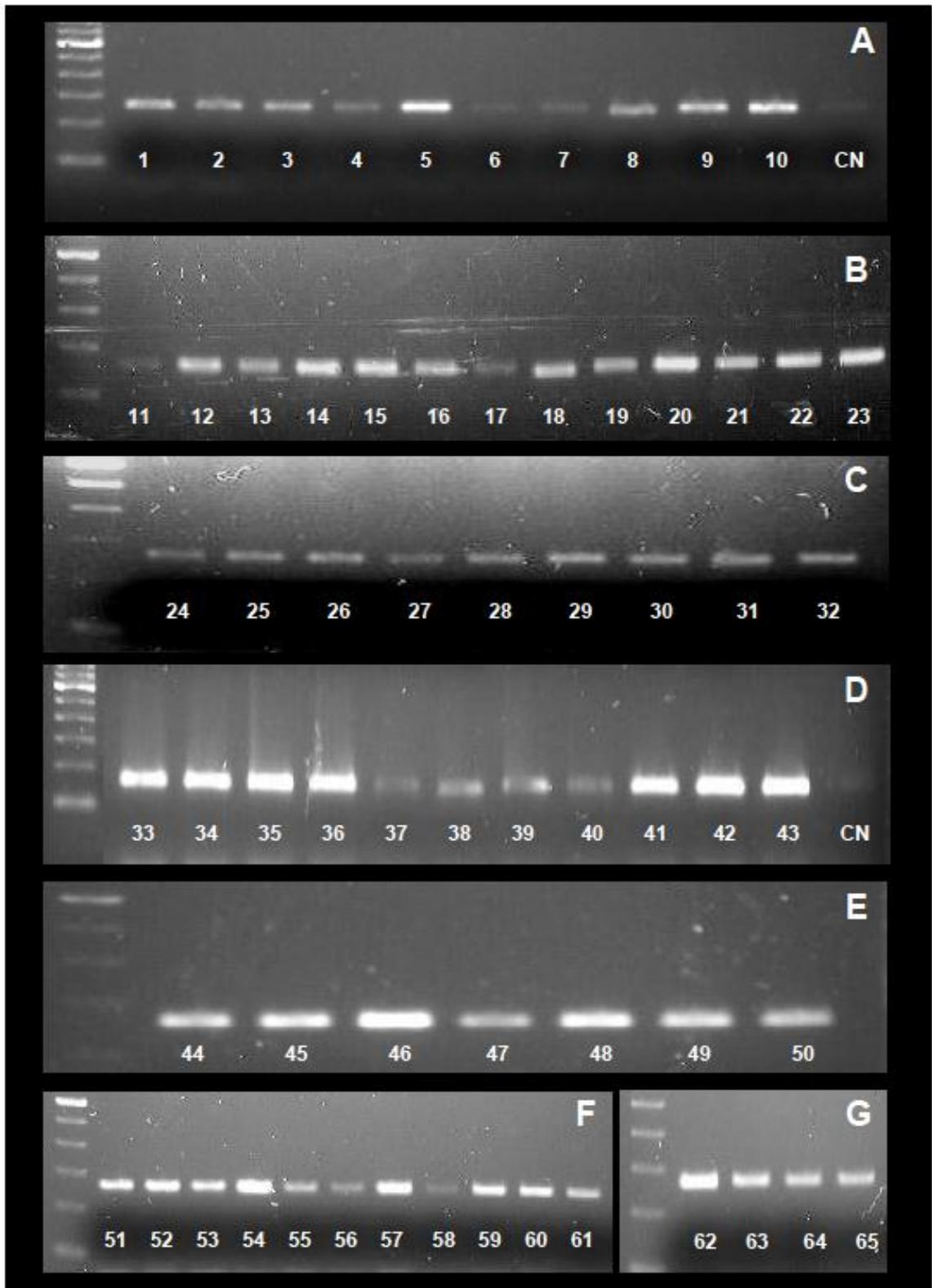
Quanto à análise da pureza do DNA pelo cálculo da razão entre as leituras A260/A280, obteve-se valores em uma escala entre 0,79  $\mu\text{g}$  e 3,0  $\mu\text{g}$ , com média de 1,2  $\mu\text{g}$ . Assim, podemos inferir que o DNA obtido na maioria das amostras apresentou grau de pureza próximo do valor desejável, porém com contaminação por outras moléculas como proteínas ou RNA.

O rendimento do DNA, mensurado pelo cálculo da concentração, variou entre 0,0075  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e 0,3525  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , e média 0,079  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , considerado adequado para posterior avaliação qualitativa por meio a técnica de PCR em todas as 100 amostras (100%).

Os valores da quantificação, grau de pureza e rendimento de todos os casos analisados estão registrados no **Anexo E**.

### 5.4 ANÁLISE QUALITATIVA DO DNA

Os resultados da análise qualitativa do DNA, pela amplificação do gene da proteína  $\beta$ -globina utilizando a técnica de PCR e eletroforese em gel de agarose a 2%, demonstraram que em 65 amostras (65%) observou-se amplificação para o gene da  $\beta$ -globina, visualizada com a presença de bancas, como mostra a **Figura 5**.



**Figura 5:** Padrão eletroforético do DNA amplificado do gene da proteína  $\beta$ -globina obtido após PCR

Dessa forma, depreende-se que o DNA dessas amostras apresenta-se íntegro, de ótima qualidade. O DNA das demais 35 amostras (35%) não foi amplificado, ainda que tenham sido avaliadas sob as mesmas condições de análise experimental pela técnica de PCR. Assim, supõe-se que o DNA dessas amostras, apesar de puro não se encontrava plenamente íntegro.

## 5.5 ANÁLISE DA DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Os resultados da análise para detecção do HPV na região de orofaringe, pela amplificação da sequência gênica da região conservada L1 do vírus, utilizando a técnica do nested PCR com o conjunto de primers PGMY09/11 (primeiro PCR) e o conjunto de primers GP5+/6+ (segundo PCR), mostraram a presença de HPV em quatro amostras (4%) dentre todos os pacientes. Dessas quatro amostras, uma é procedente de uma paciente do gênero feminino das 70 pacientes (1/70 – 1,43%), e três são de parceiros do gênero masculino (3/30 – 10%). Ressaltando que a mulher infectada não é parceira sexual de nenhum dos homens infectados pelo HPV em orofaringe. Também é importante relatar que as parceiras sexuais dos três homens infectados em orofaringe receberam o diagnóstico da doença do colo do útero em menos de um ano do período em que foi realizada a coleta da amostra de orofaringe. A **Tabela 8** apresenta as características do comportamento sexual e de algumas variáveis do perfil sociocomportamental da amostra infectada por HPV em orofaringe.

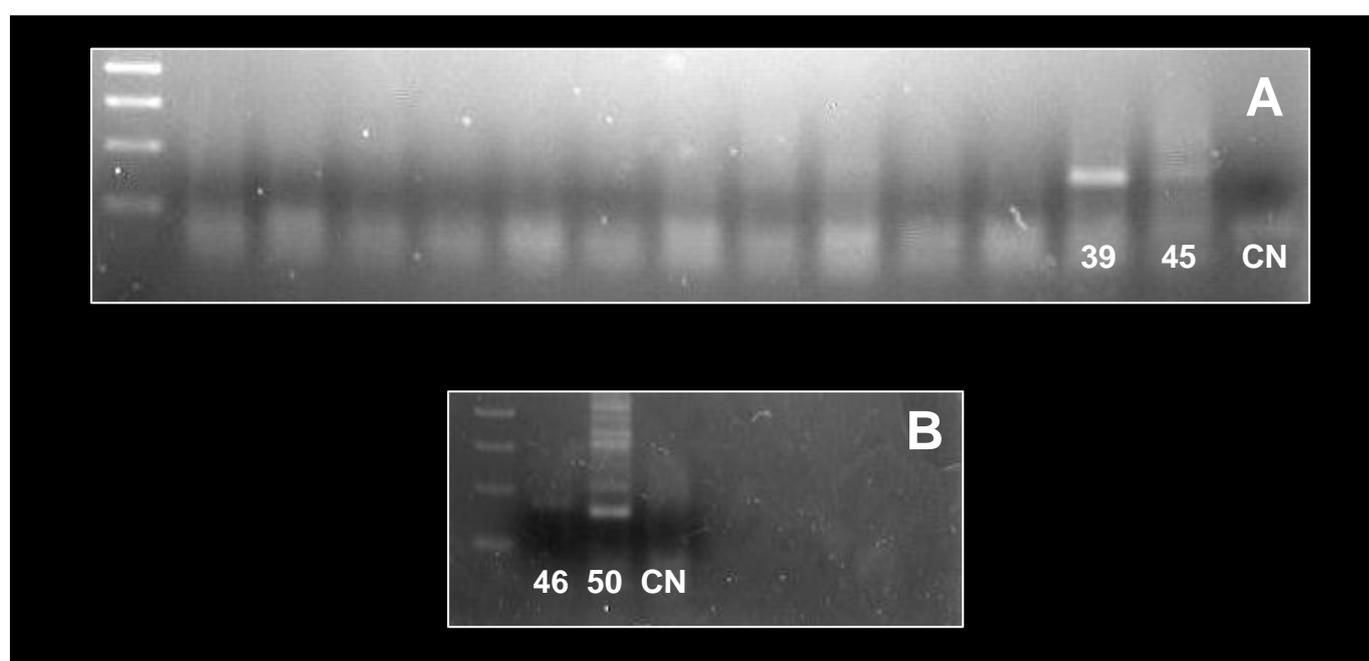
As demais 96 amostras (96%) foram negativas para HPV.

As bandas revelando positividade para HPV estão apresentadas na **Figura 6**.

**Tabela 8** – Características do comportamento sexual e sociocomportamental dos pacientes infectados por HPV em orofaringe – 1 mulher e 3 parceiros

Variável	Mulher	Parceiro 1	Parceiro 2	Parceiro 3
Idade no diagnóstico	> 30	NA	NA	NA
Outra doença HPV-positiva	Não	Não	Sim	Não
Filhos do mesmo cônjuge	Sim	Sim	Não	Sim
Número de casamentos	1	1	1	> 1
Idade do início de relação sexual	≤ 15	16 - 20	≤ 15	16 - 20
Número de parceiros (as) sexuais	≤ 5	≤ 5	≤ 5	≤ 5
Uso de camisinha	Não	Sim	Não	Sim
Doença sexualmente transmissível	Sim	Não	Sim	Não
HIV-positivo (a)	Não	Não	Não	Não
Frequência de sexo vaginal/semana	≤ 2	≤ 2	≤ 2	> 2
Sexo oral/frequência	Não	Não	Não	Sim, > 2
Doença sistêmica	Sim	Não	Sim	Não
Fumante	Não	Inativo	Inativo	Ativo
Consumo de álcool	Não	Inativo	Inativo	Ativo
Tempo de diagnóstico	> 1 ano	NA	NA	NA

\*NA = não se aplica



**Figura 6:** Padrão eletroforético do DNA do HPV, pela amplificação da sequência gênica da região conservada L1 do vírus, por meio da técnica do nested PCR (PGMY09/11 e GP5+/6+), que revelou a presença do vírus em quatro amostras, 39 e 45, 46 e 50.

## 5.6 ANÁLISE DAS VARIÁVEIS DE RISCO DA AMOSTRA

### 5.6.1 Mulheres

A análise das variáveis de risco não mostrou associação entre os fatores avaliados acerca do comportamento sexual das 70 pacientes da amostra e a transmissão orogenital do HPV.

A **Tabela 9** apresenta os resultados da análise estatística realizada para os fatores de risco. A presença do HPV em orofaringe foi independente para todas as variáveis. O valor de p (95% IC) foi equivalente a 1,0 para as variáveis “idade no período de diagnóstico”, “outra doença associada ao HPV” (além da doença do colo do útero, como verrugas de pele, relatadas pelas pacientes), “filhos do mesmo pai”, “número de casamentos”, “idade do início de relações sexuais”, “número de parceiros sexuais”, “uso de camisinha”, “se faz sexo oral e frequência em dias por semana” e “HIV-positiva”. Obteve-se o valor  $p=0,493$  para a variável “frequência de sexo vaginal em dias por semana”. Diante desses resultados, constatou-se ausência de correlação, sugerindo que, estatisticamente, a infecção por HPV em orofaringe não se associa a nenhuma dessas variáveis (**Tabela 9**).

**Tabela 9** – Análise estatística da presença do HPV em orofaringe e das variáveis de risco para as mulheres com doença do colo do útero – n=70

Variável	N	%	HPV+ oral		OR	95% IC*	p**
			N	%			
Idade no período de diagnóstico							
≤ 30	17	24,3			0,9813	0,038-25,22	1
> 30	53	75,7	1	1,4			
Outra doença relacionada ao HPV							
Sim	5	7,1			0,2519	0,009-6,95	1
Não	65	92,9	1	1,4			
Filhos do mesmo pai							
Sim	46	65,7	1	1,4	0,6596	0,026-16,83	1
Não	23	32,8					
Número de casamentos							
1	43	61,4	1	1,4	0,5472	0,021-13,94	1
> 1	26	37,1					
Nenhum	1	1,5					
Idade do início de relações sexuais							
≤ 20	58	82,8	1	1,4	1,560	0,06-40,6	1
> 20	12	17,2					
Número de parceiros sexuais							
≤ 5	54	77,1	1	1,4	1,101	0,043-28,35	1
> 5	16	22,9					
Uso de camisinha							
Sim	20	28,6			1,218	0,047-31,16	1
Não	50	71,4	1	1,4			
Frequência de sexo vaginal/semana							
≤ 2	34	48,6	1	1,4	0,3151	0,012-8,0	0,493
> 2	36	51,4					
Sexo oral/frequência							
Sim	35	50			3,0	0,118-76,2	1
Não	35	50	1	1,4			
HIV-positiva							
Sim	2	2,8			1,2	0,003-3,42	1
Não	68	97,2	1	1,4			

\*IC = intervalo de confiança

\*\*estatisticamente significante,  $p < 0,05$

### 5.6.2 Parceiros

A análise estatística das variáveis de risco para a amostra masculina, constituída por 30 parceiros das pacientes com doença do colo do útero, também não apresentou associação entre os fatores de risco do comportamento sexual e a presença do HPV em orofaringe. A **Tabela 10** apresenta os resultados da avaliação realizada para os fatores de risco avaliados.

Obteve-se valor  $p$  (95% IC) =1 para as variáveis “doença associada ao HPV”, “número de casamentos”, “idade do início de relações sexuais”, “uso de camisinha” e “doença sexualmente transmissível”. Para a variável “filhos da mesma mãe”, o valor  $p$  foi igual a 0,488,  $p=0,252$  para “frequência de sexo vaginal em dias por semana”, e  $p=0,561$  para “realização de sexo oral e frequência em dias por semana”. Dessa forma, a presença do HPV em orofaringe nos parceiros também foi independente para todos esses fatores.

O valor  $p$  foi significativo com relação à associação apenas para a variável “número de parceiras sexuais”, para qual foi obtido  $p=0,04$ . Ainda assim, os homens infectados disseram ter um total de parceiras sexuais igual ou menor que cinco durante a vida, ou seja, não possuíram um número relativamente elevado de parceiras sexuais (**Tabela 10**).

**Tabela 10** – Análise estatística da presença do HPV em orofaringe e das variáveis de risco para os parceiros sexuais atuais – n=30

Variável	N	%	HPV oral		OR	95% IC*	p**
			N	%			
Doença associada ao HPV							
Sim (verrugas genitais)	8	26,7	1	3,3	0,727	0,058-9,16	1
Não	22	73,3	2	6,7			
Filhos da mesma mãe							
Sim	23	82,1	2	7,1	2,3	0,17-30,61	0,488
Não	5	17,9	1	3,6			
Número de casamentos							
1	19	63,7	2	6,7	0,95	0,077-11,81	1
> 1	10	33,3	1	3,3			
Nenhum	1	3					
Idade do início de relações sexuais							
<20	29	97	3	10	2,81	0,09-83,16	1
>20	1	3					
Número de parceiras sexuais							
≤ 5	9	30	3	10	0,063	0,003-1,347	0,04
> 5	21	70					
Uso de camisinha							
Sim	16	53,3	2	6,7	0,571	0,047-7	1
Não	14	46,7	1	3,3			
Doença sexualmente transmissível							
Sim	10	33,3	1	3,3	1	0,081-12,4	1
Não	20	66,7	2	6,7			
Frequência de sexo vaginal/semana							
≤ 2	9	30	2	6,7	0,214	0,017-2,67	0,252
> 2	21	70	1	3,3			
Sexo oral/frequência							
Sim	18	60	1	3,3	3	0,244-36,9	0,561
Não	12	40	2	6,7			

\*IC = intervalo de confiança

\*\*estatisticamente significativa, p<0,05

## 6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, inúmeros estudos resultaram em um crescente conhecimento sobre a biologia do HPV e especificamente do ciclo viral, propriedades biológicas das proteínas virais e sua interação com as proteínas do hospedeiro. Isso levou a novos alvos potenciais de vacinas profiláticas ou terapêuticas, terapias para a infecção pelo HPV e, principalmente, ao conhecimento do comportamento das doenças e métodos de detecção do vírus. Além disso, avanços notáveis foram realizados no campo do diagnóstico para a detecção de DNA de HPV. Observou-se que hábitos sexuais, especialmente nas gerações mais jovens, como o início precoce da atividade sexual, múltiplos parceiros sexuais, sexo oral e anal, estariam associados a um maior risco de infecção pelo vírus. Isso estimulou a necessidade de campanhas adequadas de prevenção primária, dentre as quais educação sexual e programas de vacinação, e secundária, como diagnóstico de doenças relacionadas com HPV (Syrjanen *et al.*, 2012).

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) de alto risco constitui o principal agente etiológico do carcinoma de células escamosas do colo do útero (CSCC). Também está associada a um subgrupo de outras neoplasias, incluindo o carcinoma de células escamosas de orofaringe (OPSCC). A infecção pelo HPV em mucosa genital tal como em mucosa oral também pode ser subclínica ou associada a lesões benignas (Syrjanen *et al.*, 2012). Apesar da elevada taxa de infecção genital por HPV na população geral, a frequência da infecção orogenital teve menos atenção. Os poucos trabalhos que lidam com este assunto mostram resultados conflitantes (Termine *et al.*, 2009).

Este trabalho avaliou a prevalência de infecção por HPV em orofaringe de 70 mulheres com neoplasia intra-epitelial e carcinoma invasivo do colo do útero, bem como a frequência de infecção por HPV em orofaringe nos parceiros sexuais de 30 dessas mulheres, totalizando 100 pacientes. Também foi realizada uma análise da associação ou não da presença do HPV com variáveis de risco referentes ao comportamento sexual.

No presente estudo, as amostras de DNA foram obtidas pela técnica do raspado com escova citológica, que mostrou ser eficaz na obtenção de quantidades adequadas de DNA de mucosa orofaríngea. Isso permitiu a posterior realização de PCR nas amostras coletadas, reforçando os achados de alguns autores (Steinberg *et al.*, 2002, Mulot *et al.*, 2005; Garcia-Closas *et al.*, 2001). Mulot *et al.* (2005) demonstrou que amostras de células epiteliais orais coletadas tanto por meio de bochechos quanto por meio dos raspados orais com escova citológica, fornecem quantidades ótimas de DNA. Ainda, os dois métodos de coleta mostraram-se, segundo os autores, equivalentes quanto à eficácia de obtenção de DNA quando utilizada a mesma técnica de extração (Garcia-Closas *et al.*, 2001; King *et al.*, 2002). Além disso, a coleta realizada por meio de técnicas de raspado ou bochecho apresenta uma série de vantagens, dentre as quais, fácil transporte, baixo custo, facilidade de processamento, armazenamento a longo prazo, maior aceitação pelos pacientes, por ser mais confortável em relação à biópsia e indolor (Garcia-Closas *et al.*, 2001; Clark *et al.*, 2004).

Furrer *et al.* (2006) demonstraram que, em lesões potencialmente malignas e lesões malignas orais, o DNA do HPV é mais provável ser detectado em raspados de superfície de mucosa do que por meio de biópsias. Porém, os autores Stokes *et al.* (2012) não diagnosticaram HPV em fragmentos de biópsia fixados em formol e emblocados em parafina (FFPE) de lesões displásicas orais. Lawton *et al.* (1992) observaram que na mucosa oral normal houve uma maior taxa de detecção de DNA de HPV em bochechos e raspados em comparação com biópsias. Tecidos incluídos em parafina e fixados em formalina (FFPE) constituem a forma mais comum de armazenamento de espécimes humanas (Rivero *et al.*, 2006). Foi demonstrado que o DNA extraído de FFPE é adequado para amplificação em PCR, porém a qualidade dos ácidos nucléicos extraídos é baixa (Lewis *et al.*, 2001).

O DNA obtido na maioria das amostras apresentou grau de pureza próximo do valor desejável, entre 1,5 µg a 2,0 µg, porém observou-se contaminação por outras moléculas como proteínas ou RNA. O rendimento do DNA, mensurado pelo cálculo da concentração, foi adequado para posterior avaliação qualitativa e verificação da presença do HPV, ambos por meio da técnica de PCR, em todas as 100 amostras (100%). Em 65 das 100 amostras examinadas (65%), observou-se a amplificação do DNA por PCR. Portanto, nessas amostras o DNA apresentou-se

íntegro, de ótima qualidade. Isso permitiu a posterior realização de PCR, de forma segura, para detecção do HPV. O PCR das demais 35 amostras que não houve amplificação foi repetido outras vezes e novamente não mostrou bandas. Assim, supõe-se que ocorreu provável viés na proporção das quantidades dos reagentes, porém não confirmado.

Neste estudo, dentre os 100 casos avaliados, mulheres e parceiros sexuais, apenas quatro (4%) apresentaram infecção por HPV em orofaringe, utilizando a técnica do nested PCR, altamente sensível para a detecção de HPV (Fuessel Haws *et al.*, 2004). O sistema nested PCR PGMY/GP é capaz de detectar um total de 23 tipos de HPV, incluindo os tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52, 54, 54-AE9, 58, 61, 62, 66, 67, 70, 71, 72, 85, 89 e SW1. Além disso, permite a detecção de HPV em baixo número de cópias e possui maior sensibilidade aos diversos tipos de HPV, especialmente na determinação de tipos virais em amostras multiplamente infectadas.

Das 70 mulheres com lesão do colo do útero, somente em uma (1,43%) foi encontrado HPV em orofaringe. Assim, a prevalência da infecção orofaríngea nessas mulheres foi extremamente baixa. Os resultados encontrados demonstraram que, para esta amostra examinada, não há correlação de maior susceptibilidade para a infecção orofaríngea por HPV em quem possui doença do colo do útero.

A revisão da literatura mostra que apenas poucos estudos foram realizados sobre a frequência de infecção por HPV nas mucosas do colo do útero e oral, seja em mulheres saudáveis ou HIV-positivas. Um estudo semelhante ao presente trabalho (Termine *et al.*, 2009) investigou a frequência simultânea de infecção por HPV oral e do colo do útero em mulheres do sul da Itália, com aplicação de um questionário contendo variáveis sociocomportamentais. As células da mucosa oral foram coletadas por meio de raspado e a análise do DNA viral foi realizada pela técnica de PCR, seguida de sequenciamento do DNA e genotipagem. Nesse trabalho, a infecção oral por HPV foi detectada em dois dos 140 (1,4%) casos. O vírus foi encontrado em duas das 76 (2,6%) mulheres com infecção por HPV do colo do útero e em nenhuma das 64 mulheres não infectadas. Foi observada falta de concordância tipo-específica do HPV nas duas mucosas para os dois grupos de pacientes. Os dois casos de infecção oral foram pelo HPV 31, em uma mulher com

os tipos 53, 66 e 68 na amostra do colo do útero, e HPV 18 em uma mulher com o tipo 16 na amostra do colo do útero. Portanto, concluiu-se que na população examinada, a infecção por HPV do colo do útero não parece predispor à transmissão oral, mesmo na presença de hábitos sexuais orogenitais. Sugeriu-se, assim, a independência da infecção nas mucosas oral e genital.

Outra análise mais recente de Termine *et al.* (2011) também avaliou-se a frequência e a concordância dos tipos de HPV para a infecção oral em mulheres com infecção por HPV genital. Realizou-se um estudo transversal com uma amostra de 98 mulheres. A prevalência da infecção oral por HPV encontrada foi de 14,3%. Já a prevalência de concordância de tipos de HPV foi de 21,4%, apresentando diferença estatística de  $p = 0,05$ .

Em um trabalho de D`Souza *et al.* (2007), a presença de HPV oral foi avaliada pela coleta de amostras de bochecho oral em duas ocasiões com intervalo de seis meses. Essas amostras foram coletadas de 136 participantes HIV-positivas e 63 participantes HIV-negativas. Amostras de lavagens do colo do útero foram coletadas simultaneamente para comparação, após avaliação de exames de Papanicolau anteriores. A prevalência da infecção oral por HPV após seis meses foi significativamente menor que a prevalência da infecção do colo do útero. As mulheres HIV-positivas tinham mais probabilidade que as mulheres HIV-negativas para infecção oral (33% para 15%) ou do colo do útero (78% para 51%). As infecções orais detectadas no início do estudo foram tão prováveis quanto as infecções do colo do útero de persistirem por seis meses entre mulheres HIV-negativas (60% para 51%) e HIV-positivas (55% para 63%). Os tipos de HPV de alto risco 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 67, 68, 69, 70 e 73 foram encontrados nas amostras do colo do útero. Desses, apenas os tipos 51, 67, 68, 73 não foram encontrados na boca. Os tipos de baixo risco encontrados no colo do útero foram 6, 11, 40, 42, 54, 55, 57, 61, 62, 71 e 72. Desses, os tipos 6, 11, 40, 42, 54, 55, 57, 61, 62, 71 e 72 não foram detectados na boca. A taxa de infecções orais por HPV detectadas nas duas fases do estudo foi significativamente menor do que a das infecções do colo do útero entre as mulheres HIV-positivas e HIV-negativas. Assim, os resultados desse estudo demonstraram que a história natural do HPV oral e do colo do útero provavelmente seja diferente (D`Souza *et al.*, 2007).

Termine *et al.* (2011) também realizaram um estudo de meta-análise para avaliação da frequência e da concordância dos tipos de HPV para a infecção oral em mulheres com infecção por HPV do colo do útero. Nessa meta-análise, incluiu-se o estudo de Termine *et al.* (2011) anteriormente relatado e nove outros estudos publicados, totalizando um n de 1017 pacientes. Esse estudo também examinou a influência do procedimento de amostragem oral (raspado vs bochecho oral) e a relação entre a presença do HIV e o HPV oral. Nesse estudo, os critérios de elegibilidade incluíram o uso de células esfoliadas orais como método de amostragem e o diagnóstico de infecção por HPV com base na detecção do DNA do HPV.

A prevalência da infecção oral por HPV na meta-análise foi estimada em 18,1% e a prevalência da concordância de tipos de HPV foi de 27,0%, considerada estatisticamente significativa ( $P = 0,002$ ). No entanto, a presença de HIV aumentou a probabilidade de infecção oral por HPV e da concordância dos tipos de HPV. Assim, diferentemente do presente estudo e de outros relatados, observaram que a infecção oral por HPV e a concordância dos mesmos tipos de HPV em mulheres com infecção por HPV do colo do útero são mais frequentes do que se poderia esperar por acaso. Além disso, a prevalência de HPV oral e a concordância dos tipos seriam influenciadas pela imunidade.

O HPV 16 é o tipo mais frequente detectado na mucosa oral, sendo também o tipo mais comum de HPV encontrado nas lesões displásicas e carcinomas orais. A presença deste tipo de HPV oncogênico na cavidade oral deve ser acompanhada e avaliada devido à associação com a carcinogênese oral (Nair & Pillai, 2005; Adelstein *et al.*, 2009).

Em contrapartida à conclusão da meta-análise acima relatada e analisando alguns estudos separadamente, observa-se que dois estudos iniciais (Kellokoski *et al.*, 1992a,b) relataram diferentes taxas de infecção orogenital, variando de 3,8% a 23%, em relação aos métodos empregados. Na região central da Itália (Badaracco *et al.*, 1998), foi registrada uma prevalência de infecção orogenital de 50%. Entretanto, o tamanho da amostra do estudo italiano foi muito pequena ( $N=10$ ), embora os investigadores tivessem utilizado um método de detecção de HPV mais sensível do que o empregado por Kellokoski *et al.* O trabalho de Giraldo *et al.* (2005)

detectou uma maior prevalência de infecção por HPV oral em mulheres com lesões genitais causadas por HPV, em comparação com as mulheres que não tinham lesões genitais. Com base nesses dados, um risco aumentado de infecção oral em mulheres com infecção do colo do útero foi sugerido, muito provavelmente por meio da transmissão orogenital do vírus. No entanto, nessas análises há falta de uniformidade e especificidade dos métodos diagnósticos empregados, além do pequeno tamanho da amostra e da ausência de um grupo controle, o que torna os resultados conflitantes (Campisi *et al.*, 2007). Outro trabalho (Cañadas *et al.*, 2004) mostrou uma baixa frequência de infecção orogenital por HPV em uma população de alto risco, sem uma correlação significativa entre a infecção oral e genital em termos de prevalência e de concordância entre os tipos de HPV nos dois locais. Da mesma forma, uma baixa taxa (2,4%) de infecção oral por HPV foi relatada em outro estudo (Smith *et al.*, 2004), em que a infecção oral era independente da condição da presença de HPV genital e a concordância dos tipos de HPV não foi evidente. Além disso, com relação aos estudos que avaliaram mulheres HIV-positivas, outros três trabalhos (Fakhry *et al.*, 2006.; Marais *et al.*, 2008; Richter *et al.*, 2008) relataram resultados semelhantes independentemente, sugerindo assim a ausência de relação da infecção por HPV oral e genital também em pacientes de alto risco. Se validados esses achados por estudos com uma amostra maior e com base em métodos sensíveis de detecção do HPV, invalidaria a hipótese de uma maior susceptibilidade de transmissão oral na presença de infecção genital por HPV.

A baixa taxa de infecções concomitantes poderia estar relacionada às diferenças entre o colo uterino e a cavidade oral, em termos de susceptibilidade anatômica para HPV e/ou mecanismos de remoção viral (Thompson *et al.*, 2001). Entretanto, a prevalência mais alta da infecção por HPV na região de orofaringe pode ser não apenas devido às semelhanças morfológicas com o câncer do colo do útero, mas também porque o epitélio escamoso da mucosa, semelhante ao do colo do útero seria facilmente exposto à infecção viral, especificamente da região de tonsila (Frisch & Goodman, 2000; Syrjänen, 2004; Kim *et al.*, 2007). A limpeza e ação antimicrobiana da saliva pode reduzir o tempo de contato entre o vírus e a superfície epitelial da cavidade oral, reduzindo assim a probabilidade de entrada do vírus nas células alvo. O diferente ambiente, portanto, poderia justificar a baixa frequência de infecção por HPV na mucosa orofaríngea. Outra possível explicação

para a baixa taxa de infecção por HPV na orofaringe poderia ser uma possível sub-avaliação oral da infecção relacionada com o baixo número de cópias virais produzidas (Summersgill *et al.*, 2001). Uma vez que a técnica de detecção de HPV empregada neste estudo (nested PCR PGMV/GP) é considerada um método altamente sensível de detecção do vírus (Fuessel Haws *et al.*, 2004), uma possível explicação poderia ser o método de raspado utilizado para a coleta das amostras. Porém esse demonstrou obter DNA de ótima qualidade na maioria das amostras.

Na amostra masculina, constituída de 30 parceiros sexuais de 30 das mulheres avaliadas, foram encontrados três casos com infecção por HPV na mucosa de orofaringe, apresentando baixa frequência, porém significativamente maior que a presente nas mulheres. Esse resultado, como similarmente ocorreu na amostra feminina, não foi estatisticamente relevante.

Na literatura são encontrados poucos estudos que avaliaram a prevalência de infecção por HPV oral em parceiros de mulheres com doença do colo do útero. O estudo de Smith *et al.* (2004) analisou a presença de HPV em mulheres grávidas, a fim de caracterizar prevalência viral, tipos e concordância entre a infecção no colo do útero e na cavidade oral. Os parceiros do sexo masculino presentes durante a visita clínica gestacional também forneceram uma amostra da cavidade oral. Assim como encontrado nas mulheres, para a amostra masculina também não houve concordância dos tipos de HPV encontrados na mucosa oral e os tipos encontrados no colo do útero das mulheres. Assim, a fonte de infecção não parece ser via oral, pelo contato com o parceiro atual do sexo masculino, uma vez que também não houve concordância entre os parceiros. Os resultados sugeriram outras formas de transmissão do HPV, diferenças na susceptibilidade à infecção pelo HPV ou a independência da infecção na cavidade oral e na mucosa genital.

Em contrapartida, o trabalho de D`Souza *et al.* (2009) investigou se o comportamento sexual que elevou a taxa do câncer de orofaringe, aumentaria a taxa de infecção oral por HPV entre pacientes controles. A infecção por HPV foi detectada em 4,8% de 332 pacientes controles de um ambulatório clínico e em 2,9% de 210 homens universitários, com idade entre 18 e 23 anos. Entre os pacientes controles, a taxa de infecção desenvolvida aumentou independentemente do número de parceiros sexuais vaginais ou orais durante a vida. Entre os homens

universitários, a taxa de desenvolvimento de infecção oral por HPV aumentou com o aumento do número de novos parceiros sexuais orais ou de parceiros de beijo na boca. Porém, não aumentou com o aumento de parceiros sexuais vaginais. Assim, nesse estudo de D`Souza *et al.* (2009) observou-se que o sexo oral e o beijo na boca estão associados com o desenvolvimento de infecção oral por HPV. Também foi observado por Giovannelli *et al* (2007) um elevado e significativo grau de concordância entre os tipos de HPV em casais infectados simultaneamente nas áreas genitais, confirmando, assim, a transmissão do HPV. A frequência e a concordância dos tipos de HPV na cavidade oral não foram avaliadas nessa análise.

Outro objetivo deste estudo foi verificar se a história clínica e o comportamento sexual poderiam influenciar na susceptibilidade dos pacientes da amostra à infecção orogenital por HPV. Uma conclusão pode ser obtida apenas em parte, pois não foi encontrada uma associação de maior susceptibilidade para a infecção pelo HPV em orofaringe. Para o presente estudo, devido à baixa taxa de infecção por HPV detectada na orofaringe, não foi possível relacionar uma associação positiva entre a presença de doença do colo do útero, os fatores de risco e a presença de infecção por HPV em orofaringe.

Na análise deste estudo, a baixa prevalência da presença do HPV na mucosa de orofaringe das pacientes com infecção por HPV do colo do útero demonstrou ausência de associação entre a presença do HPV nas mucosas de orofaringe e do colo do útero. Também, a baixa prevalência da presença do HPV na mucosa de orofaringe dos companheiros atuais dessas mulheres sugere que a condição da presença do HPV no colo do útero não predispõe à transmissão orogenital, mesmo quando hábitos sexuais de risco foram registrados.

A ocorrência do maior número de casos HPV-positivos em orofaringe dos parceiros em comparação às mulheres, sugere que os homens podem ter maior risco de transmissão orogenital, devido à tendência de maior prevalência do HPV em orofaringe dos homens, que foi de 10% no presente trabalho. Novos estudos com amostra maior, principalmente com maior quantidade de parceiros sexuais e pacientes controles podem ser necessários para validar a suposição da transmissão orogenital.

## 7 CONCLUSÃO

- Constatou-se prevalência de 1,43% (1/70) da presença de HPV na região de orofaringe de pacientes com neoplasia intra-epitelial escamosa de alto grau e carcinoma de células escamosas invasivo do colo do útero, acompanhadas no Hospital Universitário de Brasília (HUB). Assim, foi demonstrada baixa prevalência e ausência de associação entre a presença de HPV nas mucosas de orofaringe e do colo do útero.
- Observou-se prevalência de 10% (3/30 pacientes) de HPV-positivos em orofaringe dos companheiros (parceiros sexuais atuais) das mulheres com neoplasia intra-epitelial escamosa de alto grau e carcinoma invasivo do colo do útero, sugerindo maior prevalência de HPV oral nos homens que em suas parceiras com doença do colo do útero.
- Não foram diagnosticadas lesões de cabeça e pescoço associadas ao HPV, tanto na amostra feminina quanto na amostra masculina.
- A técnica de raspado em orofaringe com escova citológica foi evidenciada como método eficaz para a obtenção de amostras de material biológico adequado quanto ao rendimento, pureza e integridade do DNA. Assim, permitiu a análise da detecção de HPV por meio da técnica do nested PCR (PGMY09/11 / GP5+/6+).
- Não foi observada associação positiva entre a presença do HPV em orofaringe e os fatores de risco relacionados ao comportamento sexual, como o sexo oral e o elevado número de parceiros sexuais durante a vida, tanto nas pacientes com lesão do colo do útero, como em seus companheiros.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. 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;23(4):271-274.
2. Adams V, Schmid S, Zariwala M, Schmid M, Kleihues P, Briner J, et al. Prevalence of human papilloma virus DNA in head and neck cancers carrying wild-type or mutant p53 tumor suppressor genes. *Anticancer Res.* 1999;19(1A):1-6.
3. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, Chaturvedi AK, D'Souza G, Gravitt PE, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck.* 2009;31(11):1393-1422.
4. Agência Internacional de Pesquisa do Câncer. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheet.asp>. Acesso em: 28. Nov. 2012.
5. Alani RM, Hasskarl J, Münger K. Alterations in cyclin-dependent kinase 2 function during differentiation of primary human keratinocytes. *Mol Carcinog.* 1998;23(4):226-233.
6. Ault KA, Future II Study Group. Effect of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like-particle vaccine on risk of cervical intraepithelial neoplasia grade 2, grade 3, and adenocarcinoma in situ: a combined analysis of four randomized clinical trials. *Lancet* 2007;369:1861-1868.

7. Badaracco G, Venuti A, Di Lonardo A, Scambia G, Mozzetti S, Benedetti Panici P, et al. Concurrent HPV infection in oral and genital mucosa. *J Oral Pathol Med.* 1998;27(3):130-134.
8. Bernard BA, Bailly C, Lenoir MC, Darmon M, Thierry F, Yaniv M. The human papillomavirus type 18 (HPV18) E2 gene product is a repressor of the HPV18 regulatory region in human keratinocytes. *J Virol.* 1989;63(10):4317-4324.
9. Bodaghi S, Wood LV, Roby G, Ryder C, Steinberg SM, Zheng ZM. Could human papillomaviruses be spread through blood? *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5428-34.
10. Bosch FX, Burchell AN, Schiffman M, Giuliano AR, de Sanjose S, Bruni L, et al. Epidemiology and natural history of human papillomavirus infections and type-specific implications in cervical neoplasia. *Vaccine.* 2008;26 Suppl 10:K1-16.
11. 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(17):2935-2939.
12. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer.* 2012.
13. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, et al. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol.* 2007;30(4):813-823.
14. Cañadas MP, Bosch FX, Junquera ML, Ejarque M, Font R, Ordoñez E, et al. Concordance of prevalence of human papillomavirus DNA in anogenital and oral infections in a high-risk population. *J Clin Microbiol.* 2004;42(3):1330-1332.

15. Canto MT, Devesa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncol.* 2002;38(6):610-617.
16. Castro TM, Bussoloti Filho I, Nascimento VX, Xavier SD. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75(2):167-171.
17. Cates W Jr. Estimates of the incidence and prevalence of sexually transmitted diseases in the United States. American Social Health Association Panel. *Sex Transm Dis.* 1999;26(4 Suppl):S2-7.
18. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol.* 2008;26(4):612-619.
19. Chen AC, Keleher A, Kedda MA, Spurdle AB, McMillan NA, Antonsson A. Human papillomavirus DNA detected in peripheral blood samples from healthy Australian male blood donors. *J Med Virol.* 2009;81(10):1792-1796.
20. Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murant T, Broker TR, Chow LT. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev.* 1995;9(19):2335-2349.
21. Chesson HW, Blandford JM, Gift TL, Tao G, Irwin KL. The estimated direct medical cost of sexually transmitted diseases among American youth, 2000. *Perspect Sex Reprod Health.* 2004;36(1):11-19.
22. Chiang CM, Dong G, Broker TR, Chow LT. Control of human papillomavirus type 11 origin of replication by the E2 family of transcription regulatory proteins. *J Virol.* 1992a;66(9):5224-5231.

23. Chiang CM, Ustav M, Stenlund A, Ho TF, Broker TR, Chow LT. Viral E1 and E2 proteins support replication of homologous and heterologous papillomaviral origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992b;89(13):5799-5803.
24. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res*. 2009;15(22):6758-6762.
25. Ciccolini F, Di Pasquale G, Carlotti F, Crawford L, Tommasino M. Functional studies of E7 proteins from different HPV types. *Oncogene*. 1994;9(9):2633-2638.
26. Clark DW, Donnelly ED, Coulter DM, Roberts RL, Kennedy MA. Linkingm Pharmacovigilance with Pharmacogenetics. *Drug Saf*. 2004;27(15):1171–1184.
27. Cozier YC, Palmer JR, Rosenberg L. Comparison of methods for collection of DNA samples by mail in the black women`s health study. *Ann Epidemiol*. 2004 Feb;14(2):117–122
28. Clifford GM, Smith JS, Aguado T, Franceschi S. Comparison of HPV type distribution in high-grade cervical lesions and cervical cancer: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2003;89(1):101-105.
29. Collins S, Mazloomzadeh S, Winter H, Blomfield P, Bailey A, Young LS, et al. High incidence of cervical human papillomavirus infection in women during their first sexual relationship. *BJOG*. 2002;109(1):96-98.
30. Davies R, Hicks R, Crook T, Morris J, Vousden K. Human papillomavirus type 16 E7 associates with a histone H1 kinase and with p107 through sequences necessary for transformation. *J Virol*. 1993;67(5):2521-2528.
31. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with

- adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol.* 1995;76 ( Pt 4):1057-1062.
32. de Villiers EM, Gissmann L, zur Hausen H. Molecular cloning of viral DNA from human genital warts. *J Virol.* 1981;40(3):932-935.
  33. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324(1):17-27.
  34. de Villiers EM, Sandstrom RE, zur Hausen H, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res.* 2005;7(1):R1-11.
  35. Di Cunto F, Topley G, Calautti E, Hsiao J, Ong L, Seth PK, et al. Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control. *Science.* 1998;280(5366):1069-1072.
  36. D'Souza G, Sugar E, Ruby W, Gravitt P, Gillison M. Analysis of the effect of DNA purification on detection of human papillomavirus in oral rinse samples by PCR. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5526-5535.
  37. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(19):1944-1956.
  38. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009;199(9):1263-1269.
  39. Du W, Pogoriler J. Retinoblastoma family genes. *Oncogene.* 2006 Aug 28;25(38):5190-5200.

40. Duensing S, Duensing A, Crum CP, Münger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer Res.* 2001;61(6):2356-2360.
41. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science.* 1989;243(4893):934-937.
42. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, Finch JL, Robinson LJ, Willson T, et al. Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *Laryngoscope.* 2007;117(12):2115-2128.
43. Evander M, Edlund K, Bodén E, Gustafsson A, Jonsson M, Karlsson R, et al. Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol.* 1992;30(4):987-992.
44. Evander M, Frazer IH, Payne E, Qi YM, Hengst K, McMillan NA. Identification of the alpha6 integrin as a candidate receptor for papillomaviruses. *J Virol.* 1997;71(3):2449-2456.
45. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol.* 2006;24(17):2606-2611.
46. Fakhry C, D'souza G, Sugar E, Weber K, Goshu E, Minkoff H, et al. Relationship between prevalent oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and -negative women. *J Clin Microbiol.* 2006;44(12):4479-4485.
47. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck

- squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(4):261-269.
48. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2893-2917.
  49. Fisher CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *International Journal of Cancer.* 2010;126(5):1256-1262.
  50. Franceschi S, Castellsagué X, Dal Maso L, Smith JS, Plummer M, Ngelangel C, et al. Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in men. *Br J Cancer.* 2002;86(5):705-711.
  51. Franceschi S, Herrero R, Clifford GM, Snijders PJ, Arslan A, Anh PT, et al. Variations in the age-specific curves of human papillomavirus prevalence in women worldwide. *Int J Cancer.* 2006;119(11):2677-2684.
  52. Frazer IH. Prevention of cervical cancer through papillomavirus vaccination. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(1):46-54.
  53. Frisch M, Goodman MT. Human papillomavirus-associated carcinomas in Hawaii and the mainland U.S. *Cancer.* 2000;88(6):1464-1469.
  54. Frisch M, Hjalgrim H, Jaeger AB, Biggar RJ. Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States. *Cancer Causes Control.* 2000;11(6):489-495.
  55. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, et al. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves

- detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods*. 2004;122(1):87-93.
56. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes Dev*. 1997;11(16):2090-2100.
  57. Furrer VE, Benitez MB, Furnes M, Lanfranchi HE, Modesti NM. Biopsy vs. superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med*. 2006 Jul;35(6):338-344.
  58. Garcia-Closas M, Egan KM, Abruzzo J, Newcomb PA, Titus-Ernstoff L, Franklin T, et al. Collection of Genomic DNA from Adults in Epidemiological Studies by Buccal Cytobrush and Mouthwash. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(6):687–696.
  59. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):709–720.
  60. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(6):407-420.
  61. Gillison ML. HPV and prognosis for patients with oropharynx cancer. *Eur J Cancer*. 2009;45(1):383-385.
  62. Giovannelli L, Campisi G, Colella G, Capra G, Di Liberto C, Caleca MP, et al. Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with

- potentially malignant and malignant oral lesions. *Mol Diagn Ther.* 2006;10(1):49-55.
63. Giovannelli L, Bellavia C, Capra G, Migliore MC, Caleca M, Giglio M, et al. HPV group- and type-specific concordance in HPV infected sexual couples. *J Med Virol.* 2007;79(12):1882-1888.
  64. Giraldo P, Gonçalves AK, Pereira SA, Barros-Mazon S, Gondo ML, Witkin SS. Human papillomavirus in the oral mucosa of women with genital human papillomavirus lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;126(1):104-106.
  65. Gissmann L, zur Hausen H. Partial characterization of viral DNA from human genital warts (*Condylomata acuminata*). *Int J Cancer.* 1980;25(5):605-609.
  66. Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlée F, Hildesheim A, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):357-361.
  67. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.
  68. He W, Staples D, Smith C, Fisher C. Direct activation of cyclin-dependent kinase 2 by human papillomavirus E7. *J Virol.* 2003;77(19):10566-10574.
  69. Heck DV, Yee CL, Howley PM, Münger K. Efficiency of binding the retinoblastoma protein correlates with the transforming capacity of the E7 oncoproteins of the human papillomaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(10):4442-4446.
  70. Helt AM, Funk JO, Galloway DA. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. *J Virol.* 2002;76(20):10559-10568.

71. Hemminki K, Dong C, Frisch M. Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *Eur J Cancer Prev.* 2000;9(6):433-437.
72. Howley PM, Lowy DR. Papillomaviruses. In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology.* 2007;2:2299–2354.
73. Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J, et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Virol.* 2007;81(18):9737-9747.
74. Hurlin PJ, Kaur P, Smith PP, Perez-Reyes N, Blanton RA, McDougall JK. Progression of human papillomavirus type 18-immortalized human keratinocytes to a malignant phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991;88(2):570-574.
75. Hussain SK, Sundquist J, Hemminki K. Familial clustering of cancer at human papillomavirus-associated sites according to the Swedish Family-Cancer Database. *Int J Cancer.* 2008;122:1873–1878.
76. Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology.* 1995;211(1):227-33.
77. Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/colo\\_uter\\_o/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home+/colo_uter_o/definicao). Acesso em: 28 nov. 2012.
78. Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(1):10-30.

79. Jones DL, Münger K. Analysis of the p53-mediated G1 growth arrest pathway in cells expressing the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol.* 1997;71(4):2905-2912.
80. Jones DL, Alani RM, Münger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes Dev.* 1997;11(16):2101-2111.
81. Kay P, Meehan K, Williamson AL. The use of nested polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism for the detection and typing of mucosal human papillomaviruses in samples containing low copy numbers of viral DNA. *J Virol Methods.* 2002;105(1):159-170.
82. Kellokoski JK, Syrjänen S, Yliskoski M, Syrjänen K. Dot blot hybridization in detection of human papillomavirus (HPV) infections in the oral cavity of women with genital HPV infections. *Oral Microbiol Immunol.* 1992a;7(1):19-23.
83. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjänen KJ. Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med.* 1992b;21(10):459-464.
84. Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR, et al. 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;120(7):1418-1425.
85. King IB, Satia-Abouta J, Thornquist MD, Bigler J, Patterson RE, Kristal AR, et al. Buccal cell DNA yield, quality, and collection costs: comparison of methods for large-scale studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Oct;11(10 Pt 1):1130-1133.

86. Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, Svare EI, Paull G, Walbomers JM, et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(2):101-106.
87. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, et al. Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999; 59(24):6132-6136.
88. Koutsky L. Epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Am J Med.* 1997;102(5A):3-8.
89. Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, Gravitt PE, Viscidi R, Garrett ES, et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. *J Infect Dis.* 2004;189(4):686-698.
90. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467-75.
91. Kufe DW, Holland JF, Frei E. American cancer society, *Cancer medicine*, 6th edition. Lewiston: BC Decker 2003; 6:2.
92. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(19):3128-3137.
93. Kupferman ME, Myers JN. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006;39(2):229-247.
94. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy

and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2009;27(12):1992-1998.

95. Lawton G, Thomas S, Schonrock J, Monsour F, Frazer I. Human papillomaviruses in normal oral mucosa: a comparison of methods for sample collection. *J Oral Pathol Med.* 1992;21(6):265-269.
96. Lewis F, Maughan NJ, Smith V, Hillan K, Quirke P. Unlocking the archive – gene expression in paraffin-embedded tissue. *J Pathol.* 2001;195(1): 66-71.
97. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM. Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells.* 1989;7:209–214.
98. Marais DJ, Passmore JA, Denny L, Sampson C, Allan BR, Williamson AL. Cervical and oral human papillomavirus types in HIV-1 positive and negative women with cervical disease in South Africa. *J Med Virol.* 2008;80(6):953-959.
99. Maufort JP, Williams SM, Pitot HC, Lambert PF. Human papillomavirus 16 E5 oncogene contributes to two stages of skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 2007;67(13):6106-12.
100. McBride AA, Romanczuk H, Howley PM. The papillomavirus E2 regulatory proteins. *J Biol Chem.* 1991;266(28):18411-18414.
101. McDougall JK. Immortalization and transformation of human cells by human papillomavirus. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;186:101-119.
102. McKaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head Neck.* 1998;20(3):250-265.
103. McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus Res.* 2009;143(2):195-208.

104. McLaughlin-Drubin ME, Meyers J, Münger K. Cancer associated human papillomaviruses. *Curr Opin Virol.* 2012;2(4):459-466.
105. Merck USA. Highlights of prescribing information: GARDASIL [human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11, 16, and 18) vaccine, Recombinant], 2008. Whitehouse Station, NJ; 2007. [http://www.merck.com/product/usa/pi\\_circulars/g/gardasil\\_pi.pdf](http://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/g/gardasil_pi.pdf) [accessed 27.09.12].
106. Michl P, Pazdera J, Prochazka M, Pink R, Stosova T. Human papillomavirus in the etiology of head and neck carcinomas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010;154(1):9-12.
107. Missero C, Di Cunto F, Kiyokawa H, Koff A, Dotto GP. The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression. *Genes Dev.* 1996;10(23):3065-3075.
108. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2001;344(15):1125-1131.
109. Mulot C, Stücker I, Clavel J, Beaune P, Lorient M. Collection of Human Genomic DNA From Buccal Cells for Genetics Studies: Comparison Between Cytobrush, Mouthwash, and Treated Card. *J Biomed Biotechnol.* 2005(3):291–296.
110. Münger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J.* 1989;8(13):4099-4105.
111. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002;89(2):213-228.

112. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol.* 2004;78(21):11451-11460.
113. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, et al. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-527.
114. Myers ER, McCrory DC, Nanda K, Bastian L, Matchar DB. Mathematical model for the natural history of human papillomavirus infection and cervical carcinogenesis. *Am J Epidemiol.* 2000;151(12):1158-1171.
115. Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis.* 2005;11(6):350-359.
116. Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer.* 2009;125(2):362-366.
117. Nguyen CL, Münger K. Direct association of the HPV16 E7 oncoprotein with cyclin A/CDK2 and cyclin E/CDK2 complexes. *Virology.* 2008;380(1):21-25.
118. Nielson CM, Harris RB, Dunne EF, Abrahamsen M, Papenfuss MR, Flores R, et al. Risk factors for anogenital human papillomavirus infection in men. *J Infect Dis.* 2007;196(8):1137-1145.
119. Olsson SE, Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Malm C, et al. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 viruslike particle (VLP) vaccine. *Vaccine* 2007;25:4931-4939.

120. Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001;2(9):533-543.
121. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer.* 2006;118(12):3030-3044.
122. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74-108.
123. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/11-25.
124. Partridge JM, Hughes JP, Feng Q, Winer RL, Weaver BA, Xi LF, et al. Genital human papillomavirus infection in men: incidence and risk factors in a cohort of university students. *J Infect Dis.* 2007;196(8):1128-1136.
125. Phelps WC, Howley PM. Transcriptional trans-activation by the human papillomavirus type 16 E2 gene product. *J Virol.* 1987;61(5):1630-1638.
126. Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, et al. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol.* 2008;44(3):242-250.
127. Pyeon D, Newton MA, Lambert PF, den Boon JA, Sengupta S, Marsit CJ, et al. Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers. *Cancer Res.* 2007;67(10):4605-4619.
128. Rady PL, Arany I, Hughes TK, Tying SK. Type-specific primer-mediated direct sequencing of consensus primer-generated PCR amplicons of human papilloma viruses: a new approach for the simultaneous detection of multiple viral type infections. *J Virol Methods.* 1995;53(2-3):245-254.

129. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2007;121(8):1813-1820.
130. Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A. E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(6):412-423.
131. Richards KL, Zhang B, Baggerly KA, Colella S, Lang JC, Schuller DE, et al. Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability. *PLoS One*. 2009;4(3):e4941.
132. Richter KL, van Rensburg EJ, van Heerden WF, Boy SC. Human papilloma virus types in the oral and cervical mucosa of HIV-positive South African women prior to antiretroviral therapy. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(9):555-559.
133. Rintala M, Grénman S, Puranen M, Syrjänen S. Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: a prospective Finnish HPV Family Study. *J Clin Virol*. 2006;35(1):89-94.
134. Rivero ER, Neves AC, Silva-Valenzuela MG, Sousa SOM, Nunes FD. Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract*. 2006 Jul;202(7):523-529.
135. Rous P, Beard JW. The Progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope). *J Exp Med*. 1935;62(4):523-548.
136. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. 1988;239(4839):487-491.

137. Saini R, Khim TP, Rahman SA, Ismail M, Tang TH. High-risk human papillomavirus in the oral cavity of women with cervical cancer, and their children. *Virology*. 2010;7:131.
138. Sang BC, Barbosa MS. Single amino acid substitutions in "low-risk" human papillomavirus (HPV) type 6 E7 protein enhance features characteristic of the "high-risk" HPV E7 oncoproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(17):8063-8067.
139. Scarinci IC, Garcia FA, Kobetz E, Partridge EE, Brandt HM, Bell MC, et al. Cervical cancer prevention: new tools and old barriers. *Cancer*. 2010;116(11):2531-2542.
140. Scheurer ME, Tortolero-Luna G, Adler-Storthz K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. *Int J Gynecol Cancer*. 2005;15(5):727-746.
141. Schiffman M, Castle PE. Human papillomavirus: epidemiology and public health. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127(8):930-934.
142. Schiffman M, Castle PE, Jeronimo J, Rodriguez AC, Wacholder S. Human papillomavirus and cervical cancer. *Lancet*. 2007;370(9590):890-907.
143. Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline. *Infect Agent Cancer*. 2009;4:8.
144. Schlecht NF, Burk RD, Adrien L, Dunne A, Kawachi N, Sarta C, et al. Gene expression profiles in HPV-infected head and neck cancer. *J Pathol*. 2007;213(3):283-293.
145. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, Mayer W, Roggenbuck B, Stremlau A, et al. Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature*. 1985;314(6006):111-114.

146. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer*. 2005;103(9):1843-1849.
147. Shin MK, Balsitis S, Brake T, Lambert PF. Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res*. 2009;69(14):5656-5663.
148. Shukla S, Bharti AC, Mahata S, Hussain S, Kumar R, Hedau S, et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian J Med Res*. 2009 Sep;130:222-233.
149. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*. 2010;116(9):2166-2173.
150. Skiadopoulos MH, McBride AA. Bovine papillomavirus type 1 genomes and the E2 transactivator protein are closely associated with mitotic chromatin. *J Virol*. 1998;72(3):2079-2088.
151. Slebos RJ, Yi Y, Ely K, Carter J, Evjen A, Zhang X, et al. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(3 Pt 1):701-709.
152. Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, Snijders PJ, Ylstra B, van de Wiel MA, et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene*. 2006;25(17):2558-2564.
153. Smith EM, Ritchie JM, Yankowitz J, Wang D, Turek LP, Haugen TH. HPV prevalence and concordance in the cervix and oral cavity of pregnant women. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2004;12(2):45-56.

154. Smith PP, Friedman CL, Bryant EM, McDougall JK. Viral integration and fragile sites in human papillomavirus-immortalized human keratinocyte cell lines. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992;5(2):150-157.
155. Stanley M, Lowy DR, Frazer I. Prophylactic HPV vaccines: underlying mechanisms. *Vaccine* 2006;24(3):S106-113.
156. Steinberg K, Beck J, Nickerson D, Garcia-Closas M, Gallaghe M, Caggana M, et al. DNA Banking for Epidemiologic Studies: A Review of Current Practices. *Epidemiology*. 2002;13(3):246–254.
157. Strati K, Lambert PF. Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer. *Cancer Res*. 2007;67(24):11585-11593.
158. Strauss S, Jordens JZ, Desselberger U, Gray JJ. Single-tube real-time nested polymerase chain reaction for detecting human papillomavirus DNA. *Diagn Mol Pathol*. 2000 Sep;9(3):151–157.
159. Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer Biol*. 1999;9(6):379-386.
160. Summersgill KF, Smith EM, Levy BT, Allen JM, Haugen TH, Turek LP. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;91(1):62-69.
161. Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol*. 2004;57(5):449-455.
162. Syrjanen S, Termine N, Capra G, Paderni C, Panzarella V, Campisi G. Oral HPV Infection: Current Strategies for Prevention and Therapy. *Curr Pharm Des*. 2012;18(34):5452-5469.

163. Talbert-Slagle K, DiMaio D. The bovine papillomavirus E5 protein and the PDGF beta receptor: it takes two to tango. *Virology*. 2009;384(2):345-51.
164. Terai M, Burk RD. Identification and characterization of 3 novel genital human papillomaviruses by overlapping polymerase chain reaction: candHPV89, candHPV90, and candHPV91. *J Infect Dis*. 2002;185(12):1794-1797.
165. Termine N, Giovannelli L, Matranga D, Perino A, Panzarella V, Ammatuna P, et al. Low rate of oral human papillomavirus (HPV) infection in women screened for cervical HPV infection in Southern Italy: A cross-sectional study of 140 immunocompetent subjects. *J Med Virol*. 2009;81(8):1438-1443.
166. Termine N, Giovannelli L, Matranga D, Caleca MP, Bellavia C, Perino A, et al. Oral human papillomavirus infection in women with cervical HPV infection: new data from an Italian cohort and a metanalysis of the literature. *Oral Oncol*. 2011;47(4):244-250.
167. Termine N, Giovannelli L, Rodolico V, Matranga D, Pannone G, Campisi G. Biopsy vs. brushing: Comparison of two sampling methods for the detection of HPV-DNA in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol*. 2012; 48(9):870-875.
168. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol*. 2011;64(4):308-312.
169. Thompson IO, van der Bijl P, van Wyk CW, van Eyk AD. A comparative light-microscopic, electron-microscopic and chemical study of human vaginal and buccal epithelium. *Arch Oral Biol*. 2001;46(12):1091-1098.
170. Thorland EC, Myers SL, Gostout BS, Smith DI. Common fragile sites are preferential targets for HPV16 integrations in cervical tumors. *Oncogene*. 2003;22(8):1225-1237.

171. Venuti A, Manni V, Morello R, De Marco F, Marzetti F, Marcante ML. Physical state and expression of human papillomavirus in laryngeal carcinoma and surrounding normal mucosa. *J Med Virol.* 2000;60(4):396-402.
172. Vidal L, Gillison ML. Human papillomavirus in HNSCC: recognition of a distinct disease type. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2008;22(6):1125-1142.
173. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189(1):12-19.
174. Weinstock H, Berman S, Cates W Jr. Sexually transmitted diseases among American youth: incidence and prevalence estimates, 2000. *Perspect Sex Reprod Health.* 2004;36(1):6-10.
175. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2008;14(2):366-369.
176. Who. Human papillomavirus vaccines: WHO position paper. *Biologicals.* 2009;37(5):338-344.
177. Woodman CB, Collins SI, Young LS. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. *Nat Rev Cancer.* 2007;7(1):11-22.
178. You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell.* 2004;117(3):349-360.
179. Zerfass-Thome K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Dürr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by

human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *J Virol.* 1995;69(10):6389-6399.

180. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Dürr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene.* 1996;13(11):2323-2330.
181. Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(1):71-74.
182. zur Hausen H. Papillomavirus infections - a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1288(2):F55-78.
183. zur Hausen H. Immortalization of human cells and their malignant conversion by high risk human papillomavirus genotypes. *Semin Cancer Biol.* 1999;9(6):405-411.
184. zur Hausen H. Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92(9):690-698.
185. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(5):342-350.
186. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009;384(2):260-265.

## ANEXOS

## ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário (a), da pesquisa intitulada *Avaliação da presença do Papilomavírus Humano na cavidade oral e orofaringe em pacientes com lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (NIC2 e NIC3) e carcinoma de células escamosas do colo do útero e seus companheiros no Hospital Universitário de Brasília, Brasília, DF*, sob a responsabilidade da pesquisadora, a Cirurgiã-dentista Ana Elizia Mascarenhas Marques. Após ser esclarecido (a) sobre a mesma e aceitando participar, assine este documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é dos pesquisadores responsáveis. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma.

Esta pesquisa tem como **objetivo geral** avaliar a presença do HPV na cavidade oral e orofaringe em pacientes com lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (NIC2 e NIC3) e carcinoma de células escamosas do colo do útero e seus companheiros atendidos no Hospital Universitário de Brasília (HUB), no período de 2000 a 2010. Para o alcance dos objetivos serão realizados procedimentos clínicos para o diagnóstico do seu caso, que são o raspado oral e orofaríngeo (*citobrush*) da parede posterior da orofaringe realizado com uma escova citológica (cytology brush) com 5 a 10 raspados, e uma entrevista com relação à história presente ou passada da ocorrência de lesões de alto grau e carcinomas invasivos associados etiológicamente ao HPV. Quanto aos desconfortos e riscos esclarecemos que:

- ✓ Fica garantido que o estudo não trará nenhuma espécie de risco, desconforto ou danos à sua pessoa;
- ✓ Sua participação não implica em despesa de qualquer natureza;
- ✓ O procedimento realizado na pesquisa será uma técnica para avaliar a presença do HPV na cavidade oral e orofaringe chamada de raspado oral, que será realizada na clínica de Estomatologia do HUB, de acordo com as normas e procedimentos dessa Clínica;
- ✓ Não há riscos para você durante a realização desses procedimentos; Esclarecemos também que o raspado oral será realizado por necessidade do caso e não somente por interesse do pesquisador, isso significa que você não será submetido a procedimento desnecessário;
- ✓ Todo o material biológico armazenado será codificado a fim de se garantir sigilo e respeito à confidencialidade. Dependendo dos resultados obtidos no presente estudo, o material armazenado poderá ser utilizado em pesquisas futuras. Caso isso ocorra, as novas pesquisas serão submetidas para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (FCS/UnB);
- ✓ Os benefícios dessa pesquisa são a futura divulgação de dados e informações científicas extremamente úteis aos estudos sobre o real papel do HPV na carcinogênese da cavidade oral e orofaringe. Ao final da pesquisa, espera-se poder contribuir para esclarecer a relação entre HPV oral e genital e dos meios de transmissão, que poderiam resultar na adoção de medidas profiláticas. A sua participação contribuirá para o maior conhecimento dos casos de presença de HPV na cavidade oral e orofaringe de pacientes que apresentam *lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (NIC2 e NIC3) e carcinoma de células escamosas* do colo do útero, bem como dos respectivos companheiros;
- ✓ Serão garantidas sessões de apoio psicológico, se necessário, com a presença de um psicólogo com experiência em cuidados oncológicos. Dessa forma, será assegurada atenção à saúde mental;

- ✓ Está assegurado sua liberdade de retirar o consentimento a qualquer momento ou deixar de participar do estudo, sem que isto lhe traga algum prejuízo;
- ✓ É assegurada ainda a não identificação dos sujeitos que participarão da pesquisa;
- ✓ Será mantido o caráter confidencial das informações obtidas;
- ✓ Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde**.

Informamos que o projeto foi elaborado tendo em vista o que preconiza a Resolução 196/96 do Ministério da Saúde, sobre pesquisa envolvendo seres humanos, resguardando, portanto, a responsabilidade ética do pesquisador. Desta forma, considerando a natureza, característica e objetivos propostos, não identificamos riscos a sua participação.

Como benefício para a instituição pesquisada espera-se **ter mais informação sobre as formas de transmissão do HPV, ampliar o conhecimento sobre a carcinogênese associada ao HPV, capacitação de recursos humanos em pesquisa na área do HPV e sua relação com o câncer de cabeça e pescoço, além de contribuir para esclarecer a relação entre HPV oral e genital e dos meios de transmissão, que poderiam resultar na adoção de medidas profiláticas.**

Tendo recebido as informações sobre a pesquisa a ser desenvolvida e ciente dos meus direitos, eu, \_\_\_\_\_, concordo em participar deste estudo como sujeito e voluntário. Fui devidamente informado (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade. Além disso, qualquer dúvida eu poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília pelo telefone 3107-1947, ou diretamente com o pesquisador, pelo telefone 3307-2295.

Brasília-DF, \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

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

\_\_\_\_\_  
PESQUISADORA:

**CIRURGIÃ-DENTISTA ANA ELIZIA MASCARENHAS MARQUES**

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecido sobre a pesquisa e aceitação do sujeito em participar.

Testemunhas:

Assinatura: \_\_\_\_\_

Assinatura: \_\_\_\_\_

## ANEXO B – PRONTUÁRIO CLÍNICO DAS MULHERES

Fundação Universidade de Brasília  
 Faculdade de Ciências da Saúde  
 Departamento de Odontologia  
 Clínica HUB

### FICHA DE ATENDIMENTO CLÍNICO

#### IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

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

**Nasc.:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ **RG:** \_\_\_\_\_ **Expedição:** \_\_\_\_\_

**Gênero:** M / F                      **Raça:** Branca / Negra / Amarela

**Pai:** \_\_\_\_\_

**Mãe:** \_\_\_\_\_

**Endereço:** \_\_\_\_\_

**Cidade:** \_\_\_\_\_ **UF:** \_\_\_\_\_ **CEP:** \_\_\_\_\_

**Naturalidade:** \_\_\_\_\_ **Nacionalidade:** \_\_\_\_\_

**Tel. de contato:** \_\_\_\_\_

**Ocupação:**

- ( ) Do lar
- ( ) Doméstica
- ( ) Funcionária Pública
- ( ) Profissional Liberal
- ( ) Outros

#### EXAME CLÍNICO: ANAMNESE

##### História da Doença Atual

1. Diagnóstico final:
2. Quando recebeu diagnóstico de lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (NIC2/NIC3) ou de carcinoma invasivo do colo do útero?
  - ( ) Há 3 meses ou menos
  - ( ) Há 6 meses
  - ( ) Há 1 ano
  - ( ) Há 2 anos
  - ( ) Há 3 anos

- ( ) Há + de 5 anos
3. Com qual idade recebeu diagnóstico de lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (NIC2/NIC3) ou de carcinoma invasivo do colo do útero?
- ( ) < 25
- ( ) 25-35
- ( ) > 35
4. Fez exame de detecção de HPV recentemente?
- ( ) Sim
- ( ) Não
5. Se sim, foi detectado HPV?
- ( ) Sim
- ( ) Não
6. Já teve alguma outra doença associada ao HPV?
- ( ) Sim
- ( ) Não
7. Se sim, em qual local do corpo?
- ( ) Cabeça e pescoço
- ( ) Outros
8. Teve câncer em outra região?
- ( ) Sim
- ( ) Não
9. Se sim, em qual local do corpo?
- ( ) Cabeça e pescoço
- ( ) Outros
10. Quais tratamentos oncológicos/ginecológicos recebidos:
- ( ) Conização (para NIC2/NIC3)
- ( ) Cirurgia
- ( ) Quimioterapia
- ( ) Radioterapia
- ( ) Outros
- ( ) Sem tratamento
- ( ) Em tratamento
11. Frequência atual das consultas de acompanhamento oncológico/ginecológico:
- ( ) Trimestral
- ( ) Semestral
- ( ) Anual
12. N° de filhos:
- ( ) < 3
- ( ) 3-7
- ( ) > 7
13. Todos os filhos são do mesmo pai?
- ( ) Sim
- ( ) Não
14. Algum dos filhos tem HPV?
- ( ) Sim
- ( ) Não
- ( ) Não sei
15. Quantas vezes foi casada?
- ( ) Nenhuma
- ( ) 1

- 2  
  $\geq 3$
16. Com qual idade iniciou relação sexual?  
  $< 12$   
 12-15  
 16-20  
  $> 20$
17. Já foi abusada sexualmente?  
 Sim  
 Não
18. Quantos parceiros sexuais já teve?  
  $\leq 5$   
 6-25  
  $> 25$
19. Faz uso de métodos contraceptivos nas relações sexuais?  
 Sim  
 Não  
 Camisinha  
 Pílula  
 Outros
20. Com que frequência faz sexo vaginal com o parceiro (por semana)?  
  $< 3$   
 3-7  
  $> 7$
21. Costuma fazer sexo oral com o parceiro?  
 Sim  
 Não
22. Com que frequência (por semana)?  
  $< 3$   
 3-7  
  $> 7$
23. Tem história de tabagismo?  
 Não  
 Sim  
 Fumou no passado  
 Fuma atualmente
24. Quantos cigarros fumados atualmente por dia?  
  $< 20$   
 20-40  
  $> 40$
25. Tem história de consumo de álcool?  
 Não  
 Sim  
 Bebeu no passado  
 Bebe atualmente
26. Quantos dias bebe por semana?  
 1  
 1-6  
 Todos
27. Tem história de uso de drogas?

- ( ) Não  
 ( ) Sim  
     ( ) Usou no passado  
     ( ) Usa atualmente

### Questionário de Saúde

	Sim	Não	Discriminação
Está sob tratamento médico?			
Está tomando algum medicamento?			
Já apresentou alguma reação à penicilina?			
Tem história de alergia?			
Tem ou teve problemas respiratórios?			
Tem ou teve doença articular? Artrite, febre reumática			
Tem ou teve distúrbio sanguíneo? Anemia, hemorragia			
Tem diabetes?			
Tem dores de cabeça frequentemente?			
Tem ou teve doença cardiovascular? Hipertensão, infarto			
Tem ou teve hepatite A? B? C?			
Tomou vacina contra hepatite?			
Está grávida? Em qual período?			
Algum problema renal/hepático?			
Já recebeu transfusão de sangue?			

Complementação das informações sobre alguma condição relevante:

---



---



---



---

### **EXAME FÍSICO**

ATM	Linfonodos	Pele	
Simetria facial	Lábios	Glândulas	
Mucosa labial	Mucosa jugal	Região retromolar	Gengiva
Palato	Língua	Assoalho	Orofaringe

**ACHADOS CLÍNICOS BUCAIS**

<b>Descrição da Lesão:</b>
<b>Hipóteses Diagnósticas:</b>

## ANEXO C – PRONTUÁRIO CLÍNICO DOS COMPANHEIROS

Fundação Universidade de Brasília  
 Faculdade de Ciências da Saúde  
 Departamento de Odontologia  
 Clínica HUB

### FICHA DE ATENDIMENTO CLÍNICO

#### IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

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

Nasc.: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ RG: \_\_\_\_\_ Expedição: \_\_\_\_\_

Gênero: M / F                      Raça: Branca / Negra / Amarela

Pai: \_\_\_\_\_

Mãe: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ UF: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_

Naturalidade: \_\_\_\_\_ Nacionalidade: \_\_\_\_\_

Ocupação: \_\_\_\_\_ Tel. de contato: \_\_\_\_\_

#### EXAME CLÍNICO: ANAMNESE

##### História da Doença Atual

1. Já teve algum tipo de câncer?  
 Sim  
 Não
2. Se sim, em qual local do corpo?  
 Cabeça e pescoço  
 Outros
3. Já apresentou alguma doença associada ao HPV?  
 Sim  
 Não
4. Se sim, com qual idade?  
 < 25  
 25-35  
 > 35
5. Se sim, em qual local do corpo?  
 Cabeça e pescoço

- Outros
6. N° de filhos:
- < 3
- 3-7
- > 7
7. Todos os filhos são da mesma mãe?
- Sim
- Não
8. Quantas vezes foi casado?
- 1
- 2
- ≥ 3
9. Com qual idade começou a ter relação sexual?
- < 12
- 12-15
- 16-20
- > 20
10. Quantas parceiras sexuais já teve?
- < 5
- 6-25
- > 25
11. Faz uso de métodos contraceptivos nas relações sexuais?
- Sim
- Não
12. Tem história de doença sexualmente transmissível?
- Sim
- Não
13. Com que frequência faz sexo vaginal com a parceira (por semana)?
- < 3
- 3-7
- > 7
14. Costuma fazer sexo oral com a parceira?
- Sim
- Não
15. Com que frequência (por semana)?
- < 3
- 3-7
- > 7
16. Tem história de tabagismo?
- Não
- Sim
- Fumou no passado
- Fuma atualmente
17. Quantos cigarros fumados atualmente por dia?
- < 20
- 20-40
- > 40
18. Tem história de consumo de álcool?
- Não
- Sim

- Bebeu no passado  
 Bebe atualmente  
 19. Quantos dias bebe por semana?  
 1  
 1-6  
 Todos  
 20. Tem história de uso de drogas?  
 Não  
 Sim  
 Usou no passado  
 Usa atualmente

Questionário de Saúde

	Sim	Não	Discriminação
Está sob tratamento médico?			
Está tomando algum medicamento?			
Já apresentou alguma reação à penicilina?			
Tem história de alergia?			
Tem ou teve problemas respiratórios?			
Tem ou teve doença articular? Artrite, febre reumática			
Tem ou teve distúrbio sanguíneo? Anemia, hemorragia			
Tem diabetes?			
Tem dores de cabeça frequentemente?			
Tem ou teve doença cardiovascular? Hipertensão, infarto			
Tem ou teve hepatite A? B? C?			
Tomou vacina contra hepatite?			
Algum problema renal/hepático?			
Já recebeu transfusão de sangue?			

Complementação das informações sobre alguma condição relevante:

---



---



---



---

**EXAME FÍSICO**

ATM	Linfonodos	Pele	
Simetria facial	Lábios	Glândulas	
Mucosa labial	Mucosa jugal	Região retromolar	Gengiva
Palato	Língua	Assoalho	Orofaringe

**ACHADOS CLÍNICOS BUCAIS**

<b>Descrição da Lesão:</b>
<b>Hipóteses Diagnósticas:</b>

## ANEXO D - APROVAÇÃO PELO COMITÊ NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA, REGISTRO Nº 106/10



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: 106/10

Título do Projeto: "Avaliação da presença do Papilomavírus Humano na cavidade oral e orofaringe em pacientes com câncer do colo do útero e seus companheiros no Hospital Universitário de Brasília, Brasília, DF".

Pesquisadora Responsável: Ana Elizvia Mascarenhas Marques

Data da Entrada: 20/08/10

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 106/10 com o título: "Avaliação da presença do Papilomavírus Humano na cavidade oral e orofaringe em pacientes com câncer do colo do útero e seus companheiros no Hospital Universitário de Brasília, Brasília, DF", analisado na 8ª Reunião Ordinária, realizada no dia 31 de agosto 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, 19 de novembro de 2010.

Prof. Natan Monsores de Sá  
Coordenador do CEP-FS/UnB

**ANEXO E – RESULTADO DA QUANTIFICAÇÃO, GRAU DE PUREZA E RENDIMENTO DOS CASOS ANALISADOS**

<b>CASOS</b>	<b>260 nm</b>	<b>280nm</b>	<b>PUREZA (A260/A280)</b>	<b>CONCENTRAÇÃO [µg/µL ]</b>
1	0,012	0,008	1,5	0,03
2	0,007	0,003	2,3	0,0175
3	0,036	0,031	1,16	0,09
4	0,066	0,056	1,18	0,165
5	0,036	0,029	1,24	0,09
6	0,131	0,108	1,21	0,3275
7	0,045	0,036	1,25	0,1125
8	0,025	0,017	1,47	0,0625
9	0,026	0,024	1,08	0,065
10	0,026	0,018	1,44	0,065
11	0,008	0,009	0,89	0,02
12	0,038	0,037	1,03	0,095
13	0,037	0,034	1,09	0,0925
14	0,028	0,021	1,33	0,07
15	0,013	0,015	0,87	0,0325
16	0,026	0,024	1,08	0,065
17	0,006	0,005	1,2	0,015
18	0,022	0,022	1,0	0,055
19	0,013	0,013	1,0	0,0325
20	0,012	0,01	1,2	0,03
21	0,011	0,014	0,79	0,0275
22	0,012	0,011	1,09	0,03
23	0,018	0,017	1,06	0,045
24	0,138	0,138	1,0	0,345
25	0,005	0,005	1,0	0,0125
26	0,004	0,005	0,8	0,01
27	0,01	0,009	1,11	0,025
28	0,007	0,007	1,0	0,0175
29	0,006	0,004	1,5	0,015
30	0,01	0,008	1,25	0,025
31	0,012	0,011	1,09	0,03
32	0,003	0,001	3,0	0,0075
33	0,016	0,012	1,33	0,04
34	0,036	0,026	1,4	0,09
35	0,141	0,127	1,11	0,3525
36	0,104	0,087	1,2	0,26
37	0,088	0,069	1,27	0,22
38	0,063	0,05	1,26	0,1575
39	0,046	0,035	1,31	0,115
40	0,033	0,028	1,2	0,0825
41	0,013	0,011	1,2	0,0325

42	0,018	0,016	1,12	0,045
43	0,104	0,098	1,06	0,26
44	0,021	0,018	1,17	0,0525
45	0,023	0,017	1,35	0,0575
46	0,035	0,028	1,25	0,0875
47	0,014	0,01	1,4	0,035
48	0,043	0,039	1,1	0,1075
49	0,112	0,107	1,05	0,28
50	0,013	0,011	1,2	0,0325
51	0,023	0,018	1,3	0,0575
52	0,042	0,036	1,17	0,105
53	0,016	0,012	1,33	0,04
54	0,03	0,024	1,25	0,075
55	0,037	0,03	1,23	0,0925
56	0,046	0,045	1,02	0,115
57	0,104	0,101	1,03	0,26
58	0,017	0,013	1,3	0,0425
59	0,033	0,031	1,06	0,0825
60	0,048	0,043	1,11	0,12
61	0,026	0,026	1,0	0,065
62	0,011	0,009	1,22	0,0275
63	0,01	0,008	1,25	0,025
64	0,007	0,005	1,4	0,0175
65	0,01	0,012	0,83	0,025
66	0,006	0,003	2,0	0,015
67	0,009	0,005	1,8	0,0225
68	0,016	0,012	1,33	0,04
69	0,003	0,001	3,0	0,0075
70	0,025	0,02	1,25	0,0625
71	0,027	0,025	1,08	0,0675
72	0,032	0,026	1,23	0,08
73	0,013	0,01	1,3	0,0325
74	0,096	0,096	1,0	0,24
75	0,01	0,01	1,0	0,025
76	0,012	0,012	1,0	0,03
77	0,009	0,006	1,5	0,0225
78	0,007	0,006	1,17	0,0175
79	0,043	0,037	1,16	0,1075
80	0,026	0,023	1,13	0,065
81	0,017	0,017	1,0	0,0425
82	0,013	0,013	1,0	0,0325
83	0,046	0,043	1,07	0,115
84	0,025	0,023	1,08	0,0625
85	0,014	0,011	1,27	0,035
86	0,015	0,012	1,25	0,0375
87	0,036	0,032	1,12	0,09
88	0,024	0,021	1,14	0,06
89	0,015	0,012	1,25	0,0375
90	0,017	0,016	1,06	0,0425
91	0,017	0,014	1,21	0,0425

<b>92</b>	0,021	0,017	1,23	0,0525
<b>93</b>	0,036	0,033	1,09	0,09
<b>94</b>	0,019	0,022	0,86	0,0475
<b>95</b>	0,019	0,016	1,2	0,0475
<b>96</b>	0,049	0,042	1,16	0,1225
<b>97</b>	0,045	0,039	1,15	0,1125
<b>98</b>	0,061	0,052	1,17	0,1525
<b>99</b>	0,044	0,036	1,22	0,11
<b>100</b>	0,052	0,046	1,13	0,13