

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

BÁRBARA MENDES PAZ

**PREVALÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM CARCINOMAS
EPIDERMÓIDES DE CAVIDADE ORAL E CORRELAÇÃO COM DADOS
CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS**

GUARAPUAVA

2016

BÁRBARA MENDES PAZ

**PREVALÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM CARCINOMAS
EPIDERMÓIDES DE CAVIDADE ORAL E CORRELAÇÃO COM DADOS
CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curso de Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Biociências aplicadas a Farmácia, da Universidade Estadual do Centro-Oeste.

Orientador: Prof. Dr. David Livingstone
Alves Figueiredo

GUARAPUAVA

2016

Catálogo na Publicação
Biblioteca Central da Unicentro, Campus Cedeteg

P348p Paz, Bárbara Mendes
Prevalência de papilomavírus humano em carcinomas epidermóides de cavidade oral e correlação com dados clínicos e histopatológicos / Bárbara Mendes Paz. -- Guarapuava, 2016
xiii, 84 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Biociências aplicadas à Farmácia, 2015

Orientador: David Livingstone Alves Figueiredo
Banca examinadora: David Livingstone Alves Figueiredo, Emerson Carraro, Luis Conti de Freitas

Bibliografia

1. Ciências Farmacêuticas. 2. Câncer de cavidade oral. 3. Câncer de boca. 4. Papilomavirus humano. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

CDD 615

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho especialmente aos meus pais **Luciane** e **Delfos**. Se hoje cheguei até aqui, foi porque vocês sempre me incentivaram e me apoiaram. Obrigada por me ensinarem as grandes lições da vida e por nunca deixarem nada me faltar.

AMO VOCÊS!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primariamente a **Deus**, por me atribuir à capacidade de discernir as grandes proezas do mundo e de fazer das minhas capacidades o seu instrumento.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. David Livingstone Alves Figueiredo**, pela grande oportunidade, por todos os ensinamentos e dedicação. Agradeço por ter sido sua aluna. Minha admiração e gratidão!

À minha amada família, meu irmão **Alexandre Mendes Paz**, que sempre esteve ao meu lado me incentivou em tudo. Agradeço também minha avó **Valderez Mendes**, que sempre torceu muito por mim. Amo vocês!

Ao meu namorado **Guilherme Chao**, que me incentivou desde o início do mestrado, e esteve sempre ao meu lado, me auxiliando em tudo. Mesmo em momentos difíceis me fez seguir em frente. Amo você! Agradeço também a sua família que torceu muito por mim.

A todos do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática, especialmente ao **Prof. Dr. Wilson, a Ane Dinarte e a Kamilla**, pela grande ajuda e ensinamentos. Sou muito grata à vocês.

A secretária **Dalvinha**, pela ajuda e das conversas harmoniosas e acolhedoras.

Ao **Prof. Dr. Fabiano P. Saggioro**, a prof. **Daniela Tirapelli** e a **Renata** pela importante colaboração na seleção dos casos e microdissecção.

Ao **Prof. Luís Conti** pelo apoio nas análises.

A técnica do laboratório, **Amélia Góes**, pelo apoio nos experimentos.

A **Prof. Paula Rahal e a Marília Calmon**, do laboratório de estudos genômicos da UNESP, pelo apoio nos experimentos.

A Fundação Araucária e o CNPq, pelo auxílio financeiro e incentivo a pesquisa.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram e colaboraram com a realização deste trabalho.

MUITO OBRIGADA!

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

cDNA.....	DNA complementar
CEC.....	Carcinoma espinocelular
CECCO.....	Carcinoma epidermóide de cavidade oral
CECCP.....	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
COMEP.....	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA.....	Ácido desoxirribonucleico
dNTP.....	Deoxinucleotídeo
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HCFMRP-USP.....	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HPV.....	Papilomavírus humano
IARC.....	International Agency for Research on Cancer
INCA.....	Instituto Nacional do Câncer
miRNA.....	Micro RNA
ml.....	Mililitro
mM.....	Milimolar
ng.....	Nanograma
nm.....	Nanômetro
OMS.....	Organização Mundial de Saúde
PCR.....	Reação em cadeia de polimerase
pRb.....	Proteína do retinoblastoma
RFLP.....	Restriction Fragments Length Polymorphism
RNA.....	Ácido ribonucléico
TCLE.....	Termo de consentimento livre e esclarecido
UNICENTRO.....	Universidade Estadual do Centro Oeste
UICC.....	International Union Against Cancer
USP.....	Universidade de São Paulo
µL.....	Microlitro
%.....	Porcentagem
®.....	Marca registrada
°C.....	Graus Celsius
[].....	Concentração

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidência mundial de câncer em homens para cada 100.000 habitantes.....	17
Figura 2. Sobrevida global de cânceres de cabeça e pescoço.....	24
Figura 3. Papel de E6 e E7 nas vias do ciclo celular e alterações genéticas em função do estado do HPV no tumor.....	27
Figura 4. Papiloma escamoso oral.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Grupamento por estádios.....	19
Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe.....	45
Tabela 3. Correlação Tabagismo e sobrevida; Etilismo e sobrevida.....	46
Tabela 4E stadiamento patológico (pTNM) dos pacientes selecionados para o estudo.....	47
Tabela 5. Correlação estadio clínico com a sobrevida.....	48
Tabela 6. Acometimento linfonodal em relação a sobrevida.....	48
Tabela 7. Correlação recidiva com sobrevida.....	49
Tabela 8. Correlação variáveis clínicas e sobrevida. Metástase e sobrevida; Segundo tumor e sobrevida.....	50
Tabela 9. Correlação HPV positivo e HPV negativo em relação a variáveis clínicas.....	52
Tabela 10. Correlação HPV positivo estadio inicial com HPV negativo estadio inicial com variáveis clínicas.....	54
Tabela 11. Correlação HPV positivo estadio avançado com HPV negativo estadio avançado com variáveis clínicas.....	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1.....	51
Gráfico 2.....	53
Gráfico 3.....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. Câncer de Cabeça e Pescoço.....	15
1.2 Câncer de cavidade oral e orofaringe.....	20
1.3. Papilomavírus Humano (HPV).....	24
1.3.1. HPV e Câncer.....	27
1.3.2. HPV e Câncer de Cavidade Oral.....	29
2. OBJETIVO	32
2.1. Objetivos Específicos.....	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1.Casuística.....	35
3.2. Microdissecção.....	36
3.3.Extração Rna e DNA.....	37
3.3.1.Extração RNA total.....	38
3.3.2. Purificação DNA genômico.....	39
3.4.Amplificação do DNA viral e genotipagem.....	40
3.5.Análise Estatística.....	42
4. RESULTADOS.....	43
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	70
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

PAZ, M. B. **Prevalência de Papilomavírus humano em carcinomas epidermóides de cavidade oral e correlação com dados clínicos e hispotalógicos**. 2016. 78f. Dissertação Parcial (Mestrado) – Universidade Estadual do Centro-Oeste. 2016

A taxa de sobrevida associada ao câncer oral é estimada em aproximadamente 40% a 50%, e está intimamente relacionada com estadiamento clínico. Tabaco e etilismo são fatores reconhecidamente carcinogênicos. O HPV é reconhecidamente associado ao desenvolvimento de câncer de orofaringe. A sua relação com os cânceres da cavidade oral tem sido estudada. Neste estudo analisamos a prevalência de HPV em tumores de cavidade oral e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos.

Metodologia: 49 casos de carcinoma epidermóide de cavidade oral foram incluídos neste estudo. A detecção do DNA do HPV foi feita por reação em cadeia da polimerase (PCR) com o conjunto de primers MY09/MY11 e GP6/GP5. Todas as amostras foram correlacionadas com dados clínicos e histopatológicos.

Resultados: A prevalência do HPV no carcinoma epidermóide de cavidade oral foi de 54% (25 pacientes). Não houve diferença significativa entre os pacientes HPV positivos e negativos em relação à idade, sexo, tabagismo e consumo de álcool, estadiamento e metástase linfonodal. Quanto ao estadiamento, 32% (n=15) dos pacientes foram diagnosticados em estadio inicial (ECI e ECII), e 67,4% (n=31) foram diagnosticados no estadio avançado (ECIII-IV). Recidivas foram associadas a um pior prognóstico e foram frequentes em tumores HPV negativo estadio avançado (p=0,04). Contudo a sobrevida foi melhor em pacientes HPV negativo (0,026).

Conclusão: Os fatores clínicos: recidiva, segundo tumor primário e metástases à distância tiveram impacto negativo na sobrevida geral. A correlação dos tumores HPV positivo com os dados clínicos e histopatológicos mostrou-se estatisticamente significante. quanto a sobrevida global, que foi maior em tumores HPV negativos. Entre tumores estadios avançado (ECIII e EC IV) as recidivas foram mais frequentes em tumores HPV negativos.

Palavras-chave: Câncer de cavidade oral; Câncer de boca; Papilomavírus humano

PAZ, M. B. **Human papillomavirus prevalence in squamous cell carcinoma of oral cavity and correlation with clinical and hispotalógicos data.** 2016. 78f. Partial Dissertation (Master) - University Estadual do Centro-Oeste. 2016

The survival rate of the oral cancer are estimated at about 40% to 50% and is closely related to clinical staging. Tabacco and alcohol consumption are known carcinogenic factors. HPV is strongly associated with oropharyngeal cancer development. Your relation with cancers of the oral cavity has been studied. In this study we analyzed the HPV prevalence in oral cavity tumors and its correlation with clinical and histopathologic data.

Methods: 49 cases squamous cell carcinoma of the oral cavity were included in this study. The detection of HPV DNA was made by polymerase chain reaction (PCR) using the primers set MY09 / MY11 and GP6 / GP5. All samples were correlated with clinical and histopathologic data.

Results: The HPV prevalence of epidermoid carcinoma of the oral cavity was 54% (25 Patients). There was no significant difference between patients HPV positive and negative in relation to age, sex, smoking and alcohol consumption, staging and lymph node metastasis. 32% (n = 15) of patients were diagnosed in early stage (T1 and T2), and 67.4% (n = 31) were diagnosed in advanced stage (T3-T4). Recurrences were associated with a worse prognosis and were common tumors in HPV negative advanced stage ($p=0.04$). However, the survival rate was better in patients negative HPV ($p=0,026$).

Conclusion: Clinical factors: recurrence, second primary tumor and distant metastases had a negative impact on overall survival. The correlation of HPV positive tumors with clinical and histopathologic data was statistically significant. as overall survival, which was higher in HPV negative tumors. Among advanced tumor stages (ECIII and stage IV) recurrences were more frequent in HPV-negative tumors.

Keywords: Oral cavity cancer; mouth cancer; Human papillomavirus

1 INTRODUÇÃO

1.1. CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

O câncer é a segunda maior causa de morte em países desenvolvidos, e evidências epidemiológicas apontam para esta tendência nos países em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou para o ano de 2030, 27 milhões de casos novos, dos quais 17 milhões morrerão devido à neoplasia. O maior aumento será em países de baixa e média renda (WHO, 2012).

Dentre os mais de 100 tipos de câncer (INCA, 2014), o câncer de cabeça e pescoço (CECCP) representa um grupo de tumores com incidência crescente, sendo o quinto tipo de câncer mais comum em todo o mundo (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015). São diagnosticados 600.000 novos casos por ano, sendo que a maioria ocorre em indivíduos do sexo masculino (JEMAL, 2011).

O CECCP constitui uma gama de doenças divididas em várias regiões anatômicas, nomeadas de: cavidade nasal e seios paranasais, cavidade oral, faringe (naso, oro e hipofaringe) e laringe (supraglótica, glótica e subglótica), cada qual com diferentes características epidemiológicas, patológicas, história natural e tratamento. Aproximadamente 95% dos tumores são carcinomas espinocelulares (CEC) (JEMAL et al., 2007; MARUR; FORASTIERE, 2008).

Dentre os tumores de cabeça e pescoço, o carcinoma de cavidade oral (CECCO) é o mais freqüente. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC– International Agency for Research on Cancer), o carcinoma de cavidade oral ocupa a 11^o posição no ranking dos tipos de cânceres mais incidentes em homens (Figura 1). De acordo com a última estimativa feita pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil os cânceres de cabeça e

pescoço estão entre os mais incidentes, sendo que em homens o carcinoma de cavidade oral e laringe ocupam, respectivamente, a quinta e sexta posição (INCA, 2014).

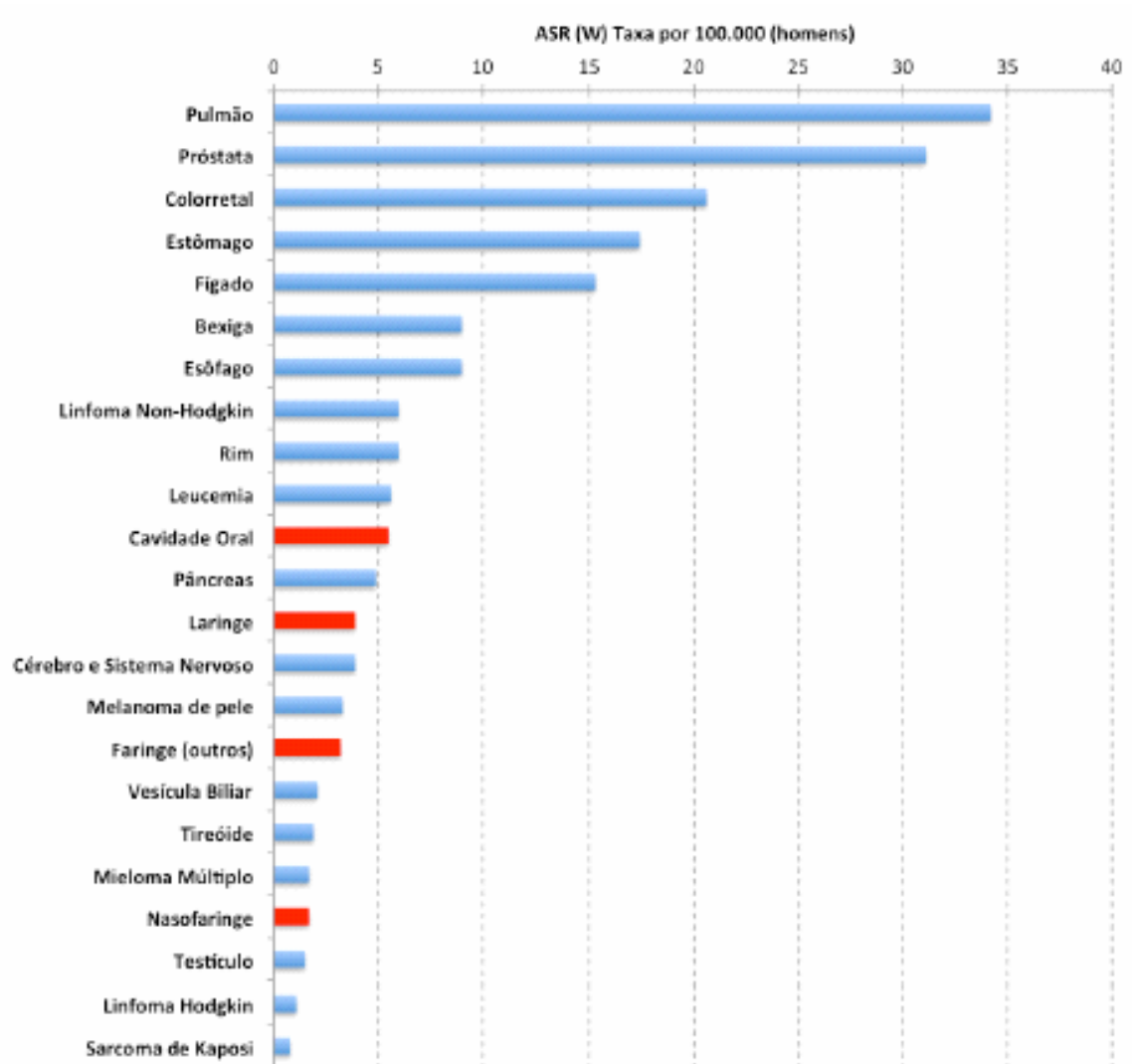


Figura 1. Incidência mundial de câncer em homens para cada 100.000 habitantes. Os cânceres de cabeça e pescoço estão destacados em cor vermelha. (Fonte: IARC, 2014).

Tabagismo e etilismo são conhecidos fatores de risco, no entanto a ocorrência de CECCP na ausência de tais fatores tem aumentado, e o HPV tem sido fortemente associado com esse grupo de tumores (HOCKING; STEIN; CONWAY, 2011; HUBBERS; AKGUL, 2015).

Em 1983, investigadores encontraram evidência imuno-histoquímica de HPV em amostras de tecido de câncer de cavidade oral. Desde então, tem havido um interesse crescente na biologia molecular do HPV em diferentes sub-sítios de cabeça e pescoço (SAULLE et al, 2015).

A localização anatômica do tumor e o estadiamento guiam a seleção do tratamento e são fatores preditores de prognóstico (GREENE et al., 2002). O sistema utilizado para classificação do estadio é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (International Union Against Cancer - UICC), conhecido como sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Este sistema baseia-se na extensão local do tumor (T), no status de linfonodos regionais (N) e na ocorrência de metástase à distância (M). Esses parâmetros recebem pontuações de T0 a T4, de acordo com o tamanho do tumor, N0 a N3 referindo-se a ocorrência de metástases linfonodais; e de M0 a M1, à metástases a distância (INCA, 2011). O grupamento por estadios está exemplificado na Tabela 1.

Embora a sobrevida se relacione com ambos, T e N, ela é mais afetada pelo estado linfonodal do paciente. O estadio T dá mais informação de prognóstico no que diz respeito à recorrência no sítio primário. Em termos de

sobrevida, os fatores prognósticos mais importantes são: a presença de metástases linfonodais (N) e a detecção de extravasamento capsular (GREENE et al, 2002). Comprometimento de linfonodos representa um pior prognóstico, com redução de aproximadamente 50% na expectativa de sobrevida (SHAH; CANDELA; PODDAR, 1990). Recidivas em carcinomas epidermóides de boca e orofaringe são frequentes em pacientes com doença em estadio avançado, e impactam de maneira negativa a sobrevida (AGRA, 2007).

Tabela 1. Grupamento por estadios

Estádio		Tumor	Linfonodo	Metástase
0		Tis	N0	M0
I	IA	T1*	N0	M0
	IB	T0	N1 _{mic}	M0
		T1	N1 _{mic}	M0
II	IIA	T0	N1	M0
		T1*	N1	M0
		T2	N0	M0
	IIB	T2	N1	M0
T3		N0	M0	
III	IIIA	T0	N2	M0
		T1*	N2	M0
		T2	N2	M0
		T3	N1	M0
		T3	N2	M0
	IIIB	T4	N0	M0
		T4	N1	M0
		T4	N2	M0
IIIC	Qualquer T	N3	M0	
IV		Qualquer T	Qualquer N	M1

*T1 inclui T1_{mic}

(Fonte: INCA, 2011). Carcinoma in situ (Tis). Tamanho do tumor (T), presença de metástase linfonodal (N) e à distância (M).

O estadios da doença afeta a sobrevida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Pacientes com estadios iniciais (I ou II) têm um índice de sobrevida livre de doença em cinco anos que varia de 70 a 90%, e naqueles com estadios mais avançados (III e IV) os índices variam de 15 a 67% (MARUR; FORASTIERE, 2008). No entanto, nem sempre a evolução dos pacientes segue essa regra, não sendo raro observar tumores com características clínicas e histopatológicas favoráveis apresentarem evoluções agressivas e, ao contrário, tumores com aspectos de mau prognóstico apresentarem evoluções mais brandas (PATEL et al., 2005; HARDISSON, 2003).

A cirurgia ou a radioterapia são tratamentos de escolha para cânceres em estadio inicial. A estratégia terapêutica adotada para os tumores avançados é a ressecção cirúrgica da lesão e radioterapia adjuvante, com ou sem quimioterapia. No entanto, apesar do tratamento agressivo da terapia combinada, estima-se que 20-36% dos pacientes sofrerão recidiva dentro de 3 a 5 anos, e aproximadamente metade dos pacientes morrerão da doença (SAHU; GRANDIS, 2011; KEARNEY et al, 2011). No geral, o prognóstico de tumores de cabeça e pescoço permanece ruim, e o tratamento agressivo impacta a qualidade de vida. Mudanças na fonação, deglutição e nutrição têm sido amplamente relatadas em sobreviventes de CECCP (ROGERS et al, 2015).

1.2. CÂNCER DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE

O termo carcinoma de cavidade oral compreende cânceres da superfície do assoalho da boca, mucosa bucal, gengiva inferior e superior, palato duro, trígono retromolar e língua. O carcinoma oral de células escamosas é a forma mais comum de câncer que afeta a cavidade oral, representando 94% das neoplasias desta região (FRAZIER et al, 2015). O carcinoma de orofaringe acomete o palato mole, a base da língua, amígdalas e parede lateral e posterior da porção superior da faringe (ZARAVINOS, 2014).

O CECCO e o câncer de orofaringe são doenças multifatoriais, influenciadas pelo meio ambiente e por fatores relacionados ao estilo de vida, particularmente o consumo do tabaco e o etilismo, identificados há muito tempo como os fatores etiológicos predominantes (JOHNSON, 2001; PETTI, 2009; FERREIRA ANTUNES et al., 2013; MAASLAND et al., 2014). O tabagismo em suas numerosas formas, incluindo o hábito de mascar o tabaco e a noz de areca, tem sido fortemente associado com o desenvolvimento do CECCO (PETTI, 2009; KHAN; TONNIES; MULLER, 2014; GUPTA; JOHNSON, 2014).

Muitos estudos têm mostrado que o uso concomitante do tabaco com a bebida alcoólica é multiplicativo para o risco de carcinoma de cavidade oral. (MASEREJIAN et al., 2006; SUBAPRIYA et al., 2007; FERREIRA ANTUNES et al., 2013). Um estudo caso controle realizado com 1144 casos e 1661 controles confirmou o efeito sinérgico desta associação. O ajuste odds ratio (OR) para fumantes que nunca beberam foi 3,50 (IC 95%, 2,76-4,44), enquanto que para tabagistas e etilistas foi de 12,60 (IC95, 7,89-20,13) (FERREIRA ANTUNES et al., 2013).

Outros fatores implicados incluem precária higiene oral, trauma crônico por próteses dentárias mal adaptadas (VELLY et al., 1998; HOOPER; WILSON;

CREAN, 2009; MEURMAN, 2010), doença periodontal (TEZAL; GROSSI; GENCO, 2005; YAO et al., 2014), infecções decorrentes de *Candida albicans* (ALNUAIMI et al, 2015), e fatores relacionados à dieta (PETTI, 2009; MEURMAN, 2010).

A incidência de CECCO tem diminuído nos últimos anos em países desenvolvidos, e isto tem sido atribuído, entre outros fatores, à redução do tabagismo e melhores condições de higiene oral (FRANCESCHI et al, 2000; STURGIS; CINCIPIRINI, 2007; PATEL et al., 2011; KANSY; THIELE; FREIER, 2014). Contudo, no Brasil, e outros países como Dinamarca e Reino Unido, a incidência de CECCO mantém-se elevada (CHATURVEDI et al, 2013).

A incidência de câncer orofaríngeo tem aumentado significativamente nos últimos 30 anos em vários países, incluindo Brasil, Canada e Estados Unidos, e o HPV têm sido implicado como a principal causa (MARUR et al, 2010; CHATURVEDI, 2012; HONG et al, 2010). As evidências da literatura estabelecem o papel do HPV na carcinogênese de orofaringe (IARC, 2007), sendo sua investigação já estabelecida em guidelines da National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2015). Enquanto a incidência de câncer orofaríngeo HPV negativo diminuiu em 50% nos Estados Unidos, a incidência de tumor orofaríngeo associado ao HPV aumentou em 225% entre 1988 e 2004, predominantemente entre os indivíduos jovens, homens e brancos (CHATURVEDI et al, 2011). Entretanto, esta associação etiológica ainda não está clara quanto ao CECCO (LEEMANS et al., 2011; KRUGER et al., 2014; SAND; JALOULI, 2014).

Em uma análise recente, com base populacional dos Estados Unidos, a prevalência do HPV em mucosa oral sadia foi significativamente maior em homens do que em mulheres, para qualquer subtipo de HPV. A prevalência da infecção pelo HPV oral entre indivíduos com idade entre 14 a 69 anos foi de 6,9% (IC 95%, 5,7% -8,3%) e do tipo de HPV 16 foi de 1,0% (IC 95%, 0,7% - 1,3%). Os autores também demonstraram que a infecção aumentou com o número de parceiros sexuais e cigarros fumados por dia (GILLISON et al, 2012). Primeira relação sexual precoce e histórico de verrugas genitais também contribui para o aumento do risco de desenvolver câncer orofaríngeo, associado à infecção por HPV (KREIMER et al., 2004). A presença de HPV em mucosa oral sadia não indica necessariamente a promiscuidade (RETTIG, KIESS, FAKHRY, 2015). Nos Estados Unidos, o HPV é uma infecção comum entre os indivíduos entre 30 e 50 anos (TOTA et al, 2011), porém muitos pacientes com CECCO-HPV positivo não tiveram múltiplos parceiros sexuais durante a vida, e alguns relatam nunca ter praticado sexo oral (D'SOUZA et al, 2007, GILLISON et al, 2008).

Apesar dos avanços, tanto no diagnóstico e tratamento, a taxa de sobrevida global em 5 anos para câncer de cavidade oral não se alterou nos últimos 40 anos (Figura 2; CASIGLIA; WOO, 2001; ROGERS et al., 2009; ALI et al., 2014; FRAZIER et al, 2015).

Enquanto o prognóstico de CECCO HPV positivos permanece controverso (KANSY; THIELE; FREIER, 2014, DESCAMPS; WATTIEZ; SAUSSEZ, 2014), a taxa de sobrevida para carcinomas orofaríngeos associados ao HPV é melhor que em tumores HPV negativo (HARRIS, et al 2011). Para o câncer de orofaringe associado ao HPV o prognóstico tem sido

favorável. A sobrevida em 5 anos para carcinoma orofaríngeo HPV positivo é estimada em 79 a 82%, enquanto que para tumores HPV negativo o índice de sobrevida é 46% (HARRIS et al, 2011).

Embora informações importantes fornecidas pelo estadiamento e outros fatores como tipo macroscópico, diferenciação celular, profundidade do tumor, tempo de história, localização topográfica e o comprometimento das margens de ressecção cirúrgica possam auxiliar a predizer o prognóstico, a evolução e resposta à terapia do carcinoma epidermóide de cavidade oral muitas vezes não corresponde a estes fatores (HARDISSON, 2003).

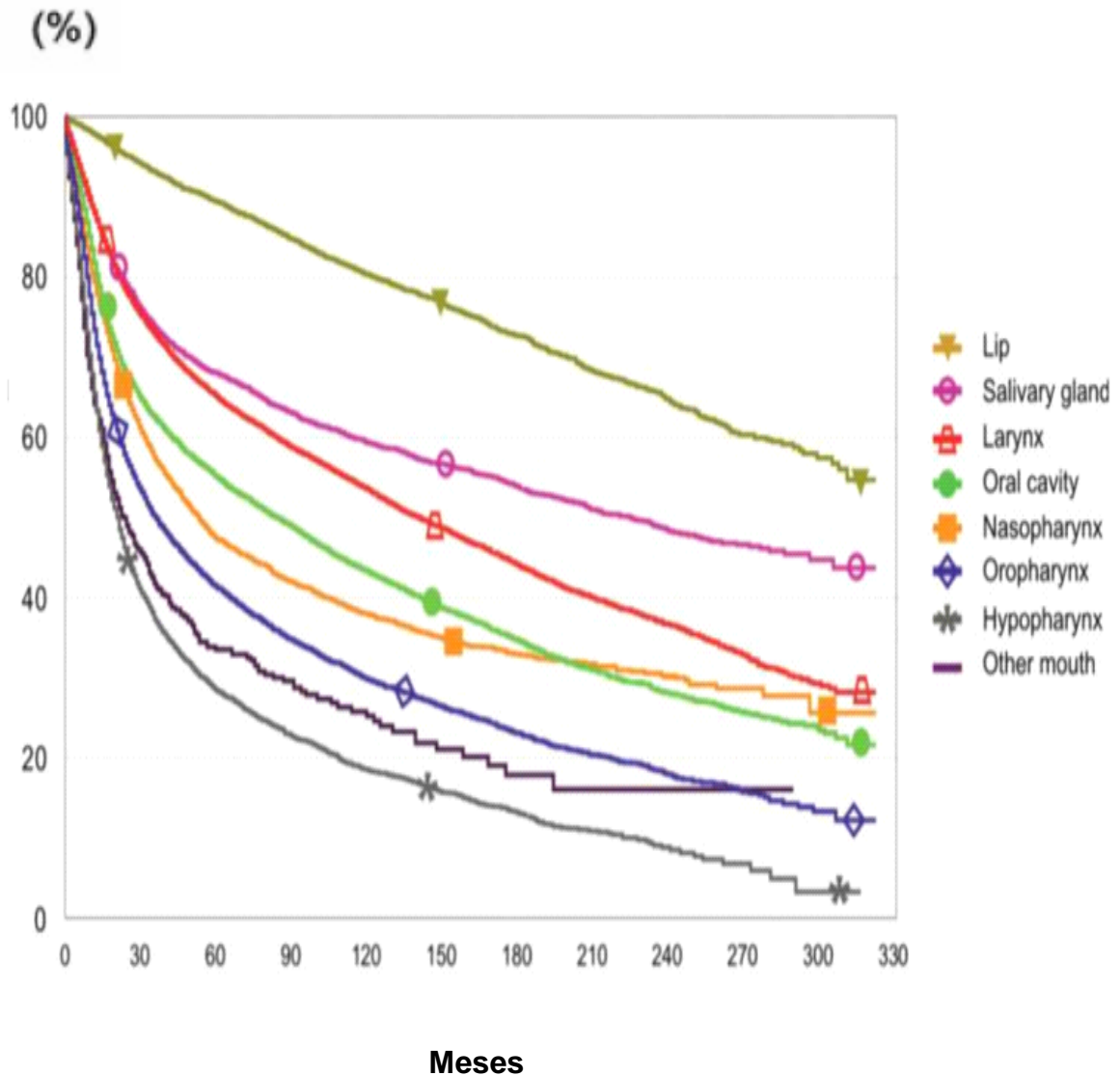


Figura 2. Sobrevida global de cânceres de cabeça e pescoço. O câncer de cavidade oral está destacado em cor verde, e em azul o câncer de orofaringe. (Modificado: CARVALHO, et al., 2005).

1.3. PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

Os vírus do papiloma humano constituem um grupo muito grande e heterogêneo de vírus, agrupados em várias espécies dentro de 5 gêneros da família Papillomaviridae. Eles têm um estrito tropismo pra epitélios escamosos e compartilham a mesma estrutura de base: são vírus pequenos, não

envelopados de formato icosaedro com diâmetro de aproximadamente 55nm. O genoma viral é DNA de cadeia dupla circular de aproximadamente 8000pb de comprimento, contido em um capsídeo composto por 72 capsômeros (PRINGLE, 2014; GRCE; STIPETIC, 2014).

Até o momento, 210 genótipos de HPV foram isolados (INTERNACIONAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS REFERENCE CENTER, 2016), dos quais aproximadamente 40 tipos podem infectar a região anogenital e a mucosa oral, ao passo que os outros podem infectar a pele (GRCE; STIPETIC, 2014). De acordo com o potencial oncogênico e o comportamento clínico de infecções por HPV, os vírus podem ser agrupados em tipos de alto risco (HR – high risk) e de baixo risco (LR – low risk). HR-HPVs incluem os subtipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45 e 52 e estão associados a lesões que têm uma propensão a sofrer carcinogênese (SAND; JALOULI, 2014). As infecções causadas por HPV tipos de alto risco 16 e 18, estão associados com mais da metade dos cânceres de colo do útero e outros carcinomas anogenitais em mulheres (vulvar, vaginal e carcinomas anais) e homens (peniano e carcinomas anais). Em contraste, os subtipos de baixo risco, tipos 6 e 11, geralmente resultam em tumores benignos verrucosos, caracterizados por uma maturação e diferenciação anormal das células epiteliais (BENSON et al., 2013; KURDGELASHVILI et al., 2013).

O processo de infecção por HPV e a transformação maligna está bem compreendido. Após a infecção, os genes E1, E2, E6 e E7 (E1 – E7) são transcritos, e os seus produtos de proteína de controle de replicação viral e transcrição de genes modulam o crescimento e proliferação das células epiteliais (HUBBERS; AKGUL, 2015).

O produto do gene E2 é um repressor transcricional que controla a expressão oncogênica das proteínas E6 e E7. Estas proteínas são os principais promotores da tumorigênese pela inativação de dois dos mais importantes supressores de tumor, pRb (proteína do retinoblastoma) e p53 (Figura 3; PRINGLE, 2014). A inibição das proteínas supressoras de tumor p53, pRb e interações com outras proteínas celulares conduz à instabilidade genômica por desativação dos mecanismos de controle de apoptose celular, o que pode favorecer a formação de lesões epiteliais (ZUR HAUSEN, 2002; PRINGLE, 2014). A expressão de E2 diminui em lesões malignas, o que favorece o aumento dos níveis de expressão de E6 e E7. Posteriormente, os genes L1 e L2 codificam as proteínas da cápside e se acumulam nas células epiteliais maduras após o início da amplificação do genoma (PRINGLE, 2014).

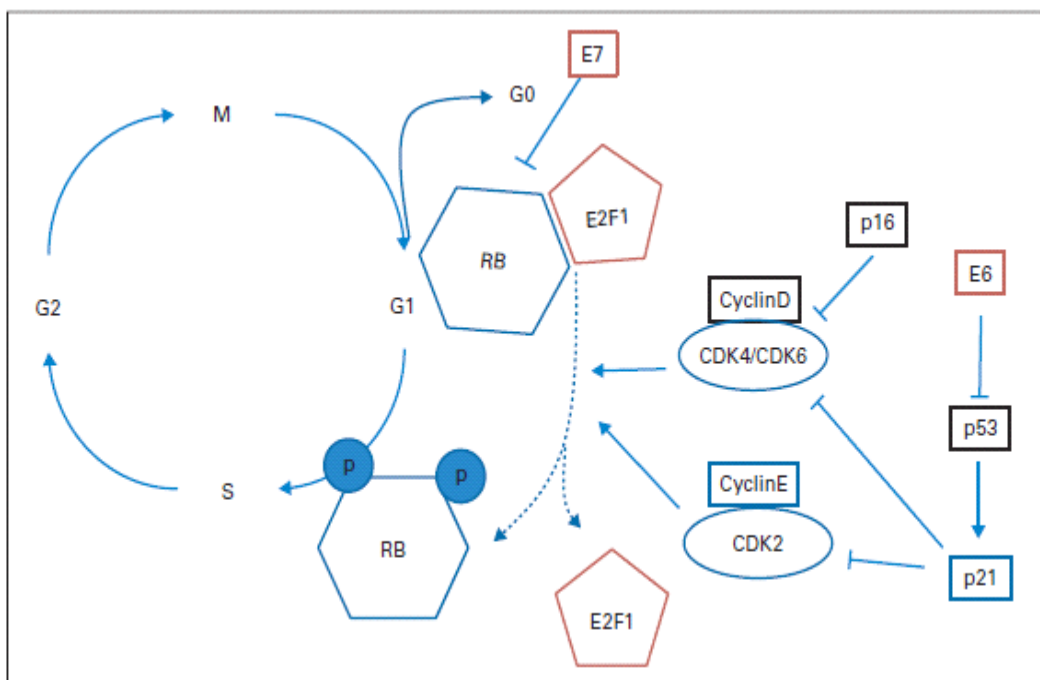


Figura 3. Papel de E6 e E7 nas vias do ciclo celular e alterações genéticas em função do estado do HPV no tumor. Os oncogenes virais alterados no estado HPV-positivo estão em vermelho, e estão em preto os genes alterados no estado HPV-negativo. RB, proteína do retinoblastoma, supressora de tumor (Fonte: HAYES; Van WAES; SEIWERT, 2015).

1.3.1. HPV e CÂNCER

O papilomavírus humano é bem conhecido pelo seu envolvimento na carcinogênese do câncer do colo do útero e da região anogenital, com uma prevalência estimada de quase 100% (SAND; JALOULI; 2014; KRUGER et al., 2014). Em outros tumores, como cânceres de pulmão e de esôfago, seu papel ainda é controverso (SAULLE et al, 2015).

A infecção por HPV é a doença sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo. Estima-se que 85% da população adulta seja portadora deste vírus, entretanto, aproximadamente 0,4% da população apresenta

verrugas exofíticas e condilomas em sua mucosa oral, enquanto que a infecção pelo HPV pode ser latente em 12% dos indivíduos com mucosa oral saudável (Figura 4; MEURMAM, 2010).

A infecção por HPV permanece uma doença predominantemente de mulheres, em grande parte devido a doenças do colo do útero. No entanto, em países com práticas de rastreio do câncer do colo do útero e câncer de cavidade oral, a diferença na incidência entre as doenças tem se estreitado. A história natural da neoplasia associada ao HPV parece variar significativamente por sexo e sítio anatômico, acometendo mais homens em doenças malignas orais (GILLISON et al, 2012).



Figura 4. Papiloma escamoso oral. (Fonte:PRINGLE, 2014).

Embora as características morfológicas e histológicas, tais como epitélio escamoso basal, pobre diferenciação e ausência de queratina possam estar associadas com a infecção por HPV, o diagnóstico do HPV é feito por meio de testes moleculares. Os testes utilizados devem estar amplamente disponíveis, validados, e de fácil apresentação. Devido às diferentes formas do vírus, os

diferentes tipos de ensaios específicos de HPV podem dar informações diferentes, DNA do HPV, RNA, e ensaios de proteína têm diferentes sensibilidades para detecção de vírus. A detecção da forma ativa do vírus de HPV é fundamental para relevância clínica. Os ensaios incluem técnicas baseadas na reação em cadeia de polimerase (PCR) (HAYES; Van WAES; SEIWERT, 2015), testes RT-PCR para RNAm de E6 e E7 (SCHLECHT et al, 2011), hibridização *in situ* de DNA (ANG et al, 2010), hibridização *in situ* de RNA (UKPO et al 2011). Além disso, uma vez que a proteína E7 de HPV degrada proteína do retinoblastoma levando a sobre-expressão de p16, a imuno-histoquímica de p16 têm sido demonstrado ser um teste sensível para a presença do HPV ativo, uma vez que se correlaciona fortemente com os resultados de outras técnicas, é amplamente disponível e fácil de interpretar. (LEWIS et al, 2010). Alguns estudos sugerem que a imuno-histoquímica de p16 como um teste de triagem que, quando positivo, procede-se com teste específico de HPV tal como PCR, ISH, ou ambos (ROBINSON et al, 2010; SCHACHE et al, 2011, SINGHI; WESTRA, 2010). Testes e marcadores de HPV podem auxiliar a escolha do regime de tratamento adequado à biologia do tumor e aconselhamento do paciente sobre a doença e prognóstico. Também podem fazer parte da investigação clínica de metástases cervicais com tumor primário oculto (LEWIS, 2012; NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2015).

1.3.2. HPV e CARCINOMA DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE

A relação entre o HPV e o CECCP foi sugerida inicialmente há duas décadas (HOBBS et al, 2006). Desde então, muitos estudos têm identificado

tipos de HPV em diferentes lesões orais, bem como na mucosa oral normal (KREIMER et al, 2013; SAND; JALOULI, 2014; KRUGER et al, 2014). Gillison et al (2012) analisaram a prevalência de HPV em uma base populacional, nos Estados Unidos, e encontraram 7% de prevalência de HPV em indivíduos com idade entre 14 a 69 anos e 1% do subtipo HPV 16 em mucosa normal. Na cavidade oral os subtipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33 e 42 têm sido isolados (DE VILLIERS et al, 2004; MEURMAN, 2010; SAND; JALOULI, 2014). No entanto, a relação da infecção por HPV é mais consistente em carcinomas da região orofaríngea (WALLINE et al, 2013; KREIMER et al, 2013).

Apesar do estado HPV positivo estar associado a um melhor prognóstico para o câncer de orofaringe, esta relação é menos evidente nos outros sítios anatômicos de cabeça e pescoço, tais como: cavidade oral, laringe e hipofaringe (KRUGER et al, 2014; DESCAMPS; WATTIEZ; SAUSSEZ; 2014).

Ragin e Taioli (2007) analisaram a relação entre o HPV e a sobrevida global de CECCP e concluíram que não houve diferenças significativas entre pacientes HPV positivo e HPV negativo, exceto em tumores de orofaringe (RAGIN; TAIOLI, 2007). Outros estudos também não acharam uma associação entre a infecção por HPV e prognóstico (SAND; JALOULI, 2014; KRUGER et al, 2014). Alguns autores relataram que a infecção oral por HPV em CECCP está associada a um risco aumentado de recidivas (HANSSON et al, 2005; ROSENQUIST et al, 2007). No entanto, outros estudos não conseguiram demonstrar uma associação entre infecção por HPV e o prognóstico (DESCAMPS; WATTIEZ; SAUSSEZ, 2014).

O papel do HPV na gênese do câncer de cavidade oral e orofaringe é cada vez mais evidente, porém o prognóstico para câncer de boca dos tumores

HPV-positivos permanece controverso (KANSY; THIELE; FREIER, 2014). Portanto, é necessária a busca por fatores que indiquem a diferença de comportamento dos tumores contribuindo na predição prognóstica e definição terapêutica.

2 OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo é identificar a prevalência de infecção por HPV em carcinomas epidermóides de cavidade oral e sua correlação com dados clínicos e histopatológicos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

As amostras de tecido tumoral foram colhidas no ato cirúrgico pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), sob coordenação e supervisão do Prof. Dr. Rui Celso Martins Mamede. Antes da coleta, o estudo foi explicado de forma clara aos pacientes, que então aprovaram o uso de suas amostras para a pesquisa, conforme documentado por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). As amostras foram estocadas no Banco de Amostras para pesquisas em marcadores moleculares no carcinoma de cabeça e pescoço, projeto aprovado pelo comitê de ética em pesquisa (processo HCRP nº 9371/2003). As amostras de tecido tumoral escolhidas para a realização deste trabalho foram coletadas entre 2003 e 2014. Os critérios de inclusão e exclusão dos pacientes para o estudo são descritos a seguir.

Critérios de Inclusão:

- Pacientes operados no serviço de cirurgia de cabeça e pescoço do HCFMRP-USP, com diagnóstico histopatológico de carcinoma de cavidade oral e orofaringe;

- Consentimento do paciente de participar do estudo (assinatura de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido);

Critérios de Exclusão:

- Ausência de precisão quanto à localização do tumor;
- Perda do seguimento clínico;

- Dados clínicos indisponíveis ou incompletos (data da cirurgia, estadiamento clínico e patológico, radioterapia pós-operatória, recidiva local, segundo tumor primário, óbito);

- Amostra com fragmento insuficiente.

3.2. MICRODISSECÇÃO

Os fragmentos colhidos no ato cirúrgico encontravam-se armazenados a temperatura de -80°C. Para a extração dos ácidos nucleicos, as amostras passaram pela revisão de um patologista, que demarcou e separou o tecido maligno.

As amostras foram retiradas para a análise envoltas em gelo seco e nitrogênio líquido. A inclusão dos fragmentos ao suporte do criostato foi feita por meio do composto comercial com temperatura ótima de corte para tecidos congelados (Tissue-tek®), depois foram embrulhados em papel alumínio. Em seguida, os cortes de 5µm foram feitos na temperatura de -26°C em um criostato (equipamento modelo IYRAXC25) e fixados em uma lâmina com auxílio de um pincel, utilizando reagente livre de RNase (rnaseawayreagent®), para evitar a degradação de RNA. Finalizada a separação, os fragmentos foram transferidos para microtubos tipo eppendorff e estocados a -80°C.

As lâminas foram coradas de acordo com a coloração hematoxilina (base d'água) – eosina (base de álcool). O procedimento de coloração consistiu em deixar as lâminas em contato com álcool 95% por 2 minutos, e lavá-las com água em seguida. Depois foram imersas em hematoxilina por 2 minutos, lavadas, e imersas rapidamente em hidróxido de amônio. As lâminas passaram

pelo processo de lavagem novamente e foram imersas em álcool 70-80% por 2 minutos. Em seguida, as lâminas foram transferidas para um recipiente contendo eosina, por 30 segundos. Por último, as lâminas foram submetidas a uma bateria de desidratação na capela, seguindo a seguinte ordem: álcool 80; álcool 90; álcool absoluto I; álcool absoluto II; álcool absoluto III; álcool e xilol; xilol I; xilol II e xilol III.

A leitura da lâmina foi feita pelo patologista que demarcou o tecido tumoral, e efetuou os cortes no micrótomo. Os fragmentos cortados foram transferidos para um novo microtubo tipo eppendorff.

3.3. EXTRAÇÃO RNA E DNA

O DNA e o RNA total das amostras foi extraído usando o método comercial AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit ® QIAGEN (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen, Valencia, CA,EUA), de acordo com o protocolo do fabricante.

Para a extração dos ácidos nucleicos, determinamos a massa dos 62 fragmentos em uma balança analítica, e utilizamos a quantidade de 30mg de cada amostra congelada. Os fragmentos com massa superior a 30ug foram cortados com uma lamina de bisturi descartável.

Os fragmentos foram depositados em um tubo de 2ml, livre de RNase, adequado para a desintegração e homogeneização. Foi adicionado ao tubo nitrogênio líquido, e agitamos a mistura com auxílio de um pilão para homogeneizar o fragmento. Em seguida, foi acrescentado 600ul de solução

tampão RLT plus (fornecido no kit) ao tecido, e a solução foi filtrada utilizando uma agulha e seringa.

O tubo foi brevemente centrifugado para reduzir a espuma, e o homogeneizado foi transferido para a coluna com filtro de DNA, acoplada em um tubo de 2ml. O tubo foi fechado e centrifugado por 30 segundos, na velocidade máxima.

A coluna com filtro de DNA foi transferida para um novo tubo de 2ml, e reservada a temperatura de 15 a 25°C, para posterior extração de DNA. A porção que passou através da coluna foi transferida para um novo tubo de 2ml para a purificação de RNA.

3.3.1. EXTRAÇÃO RNA TOTAL

Foi adicionado ao tubo 350ul de álcool 96-100% e misturado bem. Em seguida a mistura permaneceu 10 minutos incubada a temperatura ambiente. Foi acrescentado 750ul de álcool 96-100%, e novamente agitado.

Cerca de 700ul da amostra, incluindo o precipitado que foi formado, foram transferidos para uma coluna com filtro para RNA, acoplada em tubo de 2ml, e o conjunto foi centrifugado por 15 segundos a temperatura máxima. O processo foi repetido com o restante da amostra. Toda amostra que passou através da membrana foi descartado.

Para proceder à purificação, foi adicionado 500ul de solução tampão RPE (fornecida no kit) à coluna com filtro para RNA. A mistura foi novamente filtrada, por 15 segundos e filtrado foi descartado. Em seguida, foi adicionado a membrana, 10ul de solução de DNase para cada 700ul de solução RDD

(fornecida no kit). Com cuidadosas inversões a solução foi misturada, e posteriormente centrifugada para coletar os resíduos contidos nas bordas do tudo. Mistura de DNase (80ul) foi acrescentada diretamente na coluna com filtro, que permaneceu incubada em 25°C por 15 minutos.

Após o procedimento, foi adicionado à coluna, 500ul de solução tampão FRN (fornecida pelo kit) e o conjunto foi centrifugado a velocidade máxima por 15 segundos. O filtrado foi reservado. A coluna com filtro de RNA foi transferida para um novo tudo de 2ml, e o processo anterior foi repetido com o filtrado. Todo produto que passou através da membrana foi descartado.

Em seguida, 500ul de solução tampão RPE foi adicionada a membrana, e o conjunto foi novamente centrifugado por 15 segundos, a temperatura máxima. Foi adicionado 500ul de álcool 96-100% à coluna e centrifugado por 2 minutos.

A coluna com filtro de RNA foi transferida para um novo tubo de 1,5ml, e 100ul de água livre de RNase foram adicionada a membrana. O conjunto foi centrifugado por 1 minuto a 10000rpm para eluir o RNA.

Posteriormente, o RNA foi avaliado em gel de agarose 1% e a quantificação foi realizada por espectrofotometria em comprimento de onda 230nm, 260nm e 280nm, no equipamento NanoDrop® 1000 (*Thermo Fisher Scientific*).

3.3.2 PURIFICAÇÃO DO DNA GENÔMICO

Para a purificação do DNA genômico foi adicionado 350ul de solução tampão AW1 (fornecida no kit) à coluna com filtro para DNA. O conjunto foi

centrifugado por 15 segundos a temperatura máxima. Após isto, foi aplicado na membrana 20ul de proteinase k (fornecida no kit) para 60ul de solução tampão AW1. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos.

Foi adicionado novamente 350ul de solução tampão AW1 à membrana com filtro de DNA, e centrifugado novamente por 15 segundos, a temperatura máxima. Em seguida, foi acrescentado a coluna 500ul de solução tampão AW2, e o conjunto foi centrifugado por 2 minutos a temperatura máxima.

A coluna com filtro de DNA foi transferida para um novo tubo de 1,5ml, e foi adicionado 100ul de solução tampão EB (fornecida no kit). O conjunto foi incubado a temperatura ambiente, por 1 minuto, e posteriormente centrifugado a 10000rpm, por 1 min, para eluir o DNA.

3.4. AMPLIFICAÇÃO DO DNA VIRAL

O DNA foi extraído de 51 amostras e submetido a uma reação em cadeia de polimerase (PCR) com o conjunto de *primers* endógenos Gstp1 e Gstp2 (Glutathionas-S-transferases). A PCR foi realizada utilizando-se solução tampão (Buffer 10X), MgCl₂ (25mM), DMSO, dNTP (2mM), 2,5l de *primers* Gstp1/Gstp2 (10mM), 1,0 l (1U) de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 1,0 l de DNA diluído (100ng/l) e água Mili-Q q.s.p. 30ul de volume final de reação. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 95°C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 62°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos, finalizando com 72°C por 7 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com brometo de etídio e observados sob luz ultravioleta (UV) leve. As amostras que amplificaram o fragmento do gene foram submetidas a PCR para a detecção de DNA viral.

Para a amplificação do DNA viral foi utilizado o conjunto de primers MY09: 5'CGTCCMAARGGAWACTGATC3' e MY11: 5'GCMCAGGGWCATAAYAATGG3', que amplifica especificamente um fragmento do gene L1 de HPV, gerando um fragmento de aproximadamente 450pb. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 25ul, sendo composta por Buffer (10X), MgCl₂ (25mM), 1,5ul de *primers* PGMY09/11 (25mM), dNTP (2mM), 0,5 ul (1U) de *Taq DNA Polymerase*, 1,0ul de DNA diluído (100ng/l) e água Mili-Q q.s.p. 25ul de volume final de reação. O perfil de termociclagem consistiu em uma incubação inicial de 95°C por 9 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando 1 ciclo de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Posteriormente as amostras amplificadas foram ressuspendidas em 2ul de *Loading Buffer* contendo ficoll 15%, aplicadas em gel de agarose 1% e observadas sob luz ultravioleta.

As amostras que não amplificaram o fragmento de 450pb referente a um fragmento do gene L1 do vírus de HPV, foram submetidas a uma PCR com o conjunto de *primers* genéricos GP5/GP6. A reação de amplificação foi composta por solução tampão (buffer 10X), MgCl₂ (25mM), dNTP (2mM), 1,2ul de *primers* GP5/GP6 (10mM), 0,5 ul (1U) de *Taq Dna Polymerase*, 1,0ul de DNA diluído (100ng/l) e água Mili-Q completando 21ul de volume final de reação. As condições de ciclagem foram: 1 ciclo de 94°C por 3 minutos,

seguido de 40 ciclos de 94°C por 45 segundos, 45°C por 30 segundos, 72°C por 90 segundos, finalizando com 72°C por 8 minutos.

Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1%, e analisados sob luz ultravioleta leve.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis independentes definidas: (fatores de risco como tabagismo e etilismo; estadiamento clínico, sobrevida, recorrências regionais, acometimento linfonodal, desenvolvimento de segundo tumor primário e metástase à distância) foram analisadas entre os dois subgrupos de pacientes HPV-positivos e HPV-negativos, utilizando o teste de Kaplan-mayer.

4 RESULTADOS

Foram selecionadas amostras tumorais coletadas de pacientes operados pelo Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), no período que compreende os anos de 2001 a 2014, tendo como sítios primários a cavidade oral e a orofaringe. No total, foram selecionadas 77 amostras tumorais, das quais 11 foram excluídas porque estavam ausentes de tecido maligno. De acordo com a análise histopatológica, as 66 amostras restantes foram classificadas como carcinoma epidermóide.

Foram desconsideradas 17 amostras que não continham fragmentos suficientes para a extração de RNA e DNA, ou que faltavam dados clínicos e histopatológicos, restando 49 amostras. Quanto a localização anatômica, 93,87% dos tumores (n=46) estavam localizados na cavidade oral, enquanto que somente 3 casos (6,12%) estavam na orofaringe.

Os dados clínicos e histopatológicos foram criteriosamente avaliados nos casos de carcinoma de cavidade oral (n=46). A amostragem era predominantemente do sexo masculino 91% (n=42), com apenas 4 casos em mulheres. A idade dos indivíduos variou de 37 a 73 anos, com média geral de 54 anos ao diagnóstico. Em relação ao tabagismo, 89% dos pacientes (n=41) apresentaram história de consumo. No momento do diagnóstico 76% dos pacientes (n=31) ainda eram fumantes, enquanto que 24% (n=10) haviam parado de fumar. O etilismo foi observado em 76% dos pacientes (n=35), e 11 indivíduos disseram não ter o hábito de beber. Pacientes que eram etilistas e tabagistas foram estimados em 72% (n=33). (Os resultados estão agrupados na Tabela 2).

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral

PARÂMETROS	TOTAL
IDADE MÉDIA	54
SEXO:	
<i>Masculino</i>	42 (91%)
<i>Feminino</i>	4 (9%)
TABAGISMO:	
<i>Sim, ainda fuma</i>	31 (67,4%)
<i>Somente no passado</i>	10 (21,8%)
<i>Nunca fumou</i>	5 (10,8%)
ETILISMO:	
<i>Sim, ainda bebe</i>	35 (76%)
<i>Somente no passado</i>	0 (0%)
<i>Nunca bebeu</i>	11 (24%)

O tempo de sobrevida foi definido como o tempo entre a data da cirurgia e a data do último exame de acompanhamento ou a data da morte. A média de acompanhamento foi de 60 meses, 25 pacientes (54%) foram a óbito neste período, todos pela neoplasia.

Quanto ao impacto do tabagismo e do etilismo na sobrevida, não houve diferença significativa nos pacientes fumantes e não fumantes. Dos 41 indivíduos tabagistas, 22 (53,6%) foram a óbito, e dos 5 casos não fumantes, 3 pacientes (60%) morreram devido à neoplasia. Em relação ao consumo de

álcool, dos 35 indivíduos etilistas, 54,3% (n=19) foram à óbito, enquanto que 16 etilistas (45,7%) continuam vivos. (Os dados estão agrupados na tabela 3).

Tabela 3. Correlação Tabagismo e sobrevida; Etilismo e sobrevida.

	VIVOS			ÓBITOS			P	
	N	% Vivos	% Total	n	% óbitos	% Total		
TABAGISMO	Não	02	9,5%	4,3%	03	12,0%	6,5%	0,788
	Sim	19	90,5%	41,3%	22	88,0%	47,8%	
ETILISMO	Não	05	23,8%	10,9%	6	24,0%	13,0%	0,988
	Sim	16	76,2%	34,8%	19	76,0%	41,3%	

O estadiamento patológico (pTNM) foi calculado em 2,1% (n=1) para T1, 30,4% (n=14) para T2, 19,5% (n=9) para T3 e 47,8% (n=22) para T4. (Os dados estão agrupados na Tabela 4). Em relação ao estadio clínico (EC) 32,6% foram diagnosticados em estadio inicial (TI-TII) (n=15), e 67,4% (n=31) foram diagnosticados no estadio avançado (TIII-TIV). Não foi encontrado em nossos dados nenhuma correlação estatística significativa do estadio clínico com a sobrevida. Pacientes estadio T1 e T2 tiveram índice de sobrevida de 60%, e pacientes estadio T3 e T4 tiveram índice de 38,7%. (Os dados estão agrupados na Tabela 5).

Tabela 4. Estadiamento patológico (pTNM) dos pacientes selecionados para o estudo

PACIENTE	ESTADIAMENTO INICIAL	PACIENTE	ESTADIAMENTO AVANÇADO
CP5/0028	T2 N0	CP5/0022	T3 N2a
CP5/0102	T2 N0	CP5/0042	T4 N0
CP5/0111	T1 N0	CP5/0084	T4 N0
CP5/128	T2 N0	CP5/0107	T2 N1
CP5/0265	T2 N0	CP5/0136	T4a N2b
CP5/0293	T2 N0	CP5/0138	T2 N1
CP5/0301	T2 N0	CP5/0191	T3 N0
CP5/0307	T2 N0	CP5/0195	T4 N1
CP5/0352	T2 N0	CP5/0234	T2 N1
CP5/0363	T2 N0	CP5/0237	T2 N1
CP5/0378	T2 N0	CP5/0238	T3 N0
CP5/0379	T2 N0	CP5/0259	T3 N0
CP5/410	T2 N0	CP5/0263	T4 N0
		CP5/0282	T4 N1
		CP5/0284	T3 N2b
		CP5/0291	T4b N3
		CP5/0305	T4 N0
		CP5/0316	T4 N2b
		CP5/0321	T4a N2c
		CP5/0338	T2 N2b
		CP5/0340	T4a N3
		CP5/0341	T3 N0
		CP5/0354	T2 N1
		CP5/0355	T3 N0
		CP5/0362	T4 N0
		CP5/0404	T2 N2
		CP5/0406	T2 N2b
		CP5/0419	T1 N2
		CP5/0422	T3 N0
		CCP/28	T2 N2c
		CCP/35	T4a N1

Tabela 5. Correlação estadio clínico com a sobrevida

		VIVOS			ÓBITOS			P
		N	%	% Total	n	% óbitos	% Total	
			Vivos					
ESTADIO CLÍNICO	I e II	9	42,9%	19,6%	6	24,0%	13%	0,174
	III e IV	12	57,1%	30,4%	19	76,0%	41,3%	

Metástases linfonodais ao diagnóstico foram observadas em 43,5% dos pacientes (n=20). Não houve correlação do acometimento linfonodal com a sobrevida. Dos pacientes com comprometimento linfonodal, 35% (n=7) continuam vivos, enquanto que 65% (n=13) foram a óbito. Em relação ao estado N0, foram a óbito 12 pacientes e 14 continuam vivos até o ano de 2016. Os resultados estão agrupados na Tabela 6.

Tabela 6. Acometimento linfonodal em relação a sobrevida

		VIVOS			ÓBITOS			P
		N	%	%	n	%	%	
			Vivos	Total		óbitos	Total	
ACOMETIMENTO LINFONODAL	N0	14	66,7%	30,4%	12	48,0%	26,1%	0,203
	N+	7	33,3%	15,2%	13	52,0%	28,3%	

Em relação às variáveis clínicas, 34,8 % dos pacientes (n=16) sofreram recidiva. A recidiva local teve impacto negativo no prognóstico, 75% dos

pacientes que sofreram recidiva (n=12) foram a óbito, enquanto que 43,3% pacientes que não sofreram recidiva, (n=13) faleceram (p=0,04). (Os dados estão agrupados na tabela 7).

Tabela 7. Correlação recidiva com sobrevida

	VIVOS			ÓBITOS			P	
	N	%	%	N	%	%		
		Vivos	Total		óbitos	Total		
RECIDIVAS	Não	17	81,0%	37,0%	13	52,0%	28,3%	0,040
	Sim	04	19,0%	8,7%	12	48,0%	26,1%	

O desenvolvimento de segundo tumor primário foi observado em 13% dos casos (n=6) (p=0,053). Destes, somente 1 caso foi a óbito. Durante o acompanhamento, metástases à distância foram observadas em 4 casos (8,7%) e todos foram a óbito (p=0,005). Dos pacientes que não sofreram metástase, (50%) foram a óbito. (Os resultados estão agrupados na Tabela 8).

Tabela 8. Correlação variáveis clínicas e sobrevida. Metástase e sobrevida; Segundo tumor e sobrevida.

	VIVOS			ÓBITOS			P	
	N	% Vivos	% Total	N	% óbitos	% Total		
METÁSTASE	Não	21	100,0%	45,7%	21	84,0%	45,7%	0,055
	Sim	00	0,0%	0,0%	04	16,0%	8,7%	
SEGUNDO TUMOR	Não	16	76,2%	35,6%	24	95,8%	51,1%	0,053
	Sim	05	23,8%	11,1%	01	4,2%	2,2%	

O DNA do HPV foi detectado em 25 casos (54,3%). Em dois casos, a integridade do DNA não foi confirmada pela PCR com o conjunto de primers Gstp1 e Gstp2, e, portanto foram descartados das análises. As 21 amostras que não amplificaram o fragmento de 450pb na reação com o par de primers MY09/11, também não obtiveram produto de amplificação na reação com o conjunto de *primers* genéricos GP5/GP6.

No que se refere ao prognóstico, tumores HPV-positivo tiveram índice de sobrevida em 5 anos de 40%, enquanto que pacientes HPV negativo tiveram taxa de sobrevida de 52,3%. Foram a óbito 15 pacientes HPV positivo, e 11 continuam vivos. Dos casos de HPV negativo, 11 indivíduos estão vivos, enquanto 15 faleceram devido à neoplasia. Analisamos o impacto do HPV na sobrevida geral em 10 anos, e a sobrevida dos casos HPV positivo foi significativamente pior comparada aos casos HPV negativo. Os resultados são mostrados no gráfico 1.

ESTIMATIVA DE SOBREVIDA				
	Média	EP	χ^2	Log Rank P1
HPV (-)	73,5	9,8	4,939	0,026
HPV (+)	53,4	7,7		

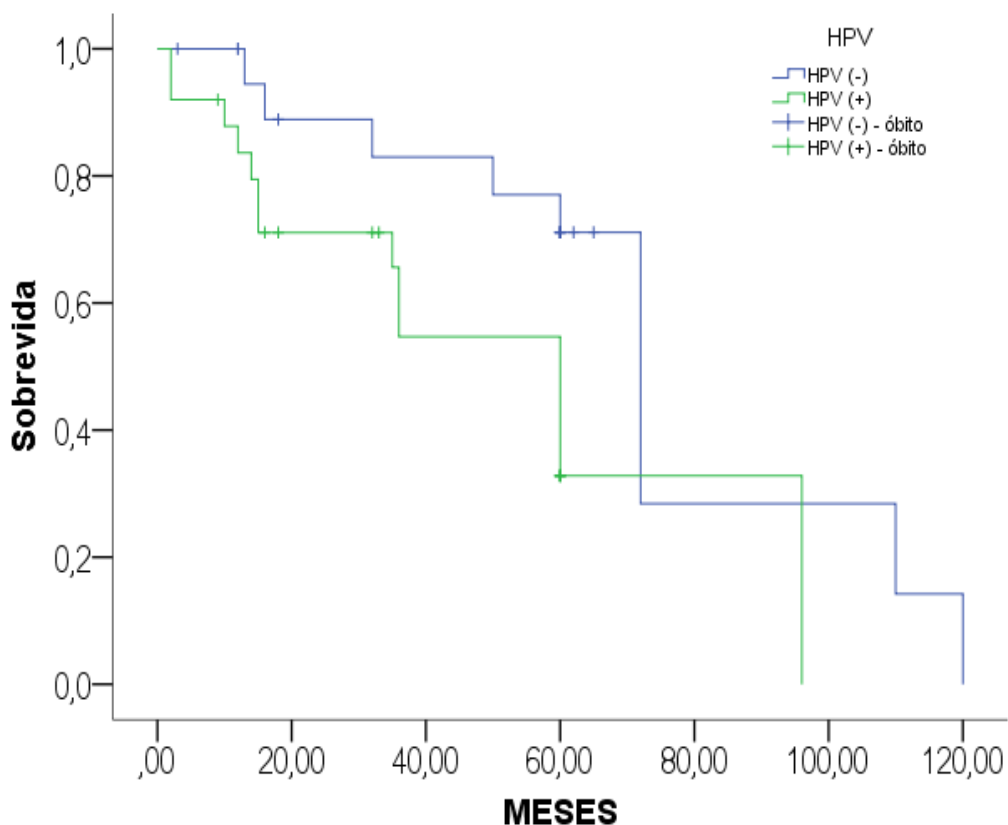


Gráfico 1. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Pacientes operados com diagnóstico histopatológico de carcinoma de cavidade oral (n=46)

Dos 25 casos HPV positivos analisados, 23 indivíduos (92%) eram fumantes, e apenas 2 pessoas (8%) nunca fumaram. O tamanho do tumor, e comprometimento de linfonodos não diferiram entre os pacientes com CECCP HPV positivo e HPV negativo. Recidivas ocorreram em 7 casos (28%) HPV positivo e em 9 casos (42,8%) HPV negativo. Os 4 casos que sofreram metástase eram HPV positivo, enquanto que nenhum caso HPV negativo

sofreu metástase. Não houve correlação quanto ao desenvolvimento de segundo tumor, em tumores HPV positivo e HPV negativo. (Os dados estão agrupados na tabela 9).

Tabela 9. Correlação HPV positivo e HPV negativo em relação a variáveis clínicas.

		HPV-			HPV+			P
		N	% HPV-	% TOTAL	N	% HPV+	% TOTAL	
METÁSTASE	Não	21	100,0%	44,9%	21	84,0%	46,9%	0,117
	Sim	00	0,0%	0,0%	04	16,0%	8,2%	
RECIDIVAS	Não	12	57,2%	24,5%	18	72,0%	38,8%	0,253
	Sim	9	42,8%	20,4%	7	28,0%	16,3%	
SEGUNDO TUMOR	Não	17	85,0%	37,5%	21	87,5%	50,0%	0,741
	Sim	03	15,0%	6,3%	03	12,5%	6,3%	
TABAGISMO	Não							0,365
	Fumante	03	14,3%	6,1%	02	8,0%	4,1%	
	Fumante	18	85,7%	38,8%	23	92,0%	51,0%	

CECCO HPV positivo que sofreram recidivas tiveram o pior prognóstico comparado aos demais grupos (CECCO HPV positivo sem recidiva, CECCO HPV negativo sem negativo e CECCO HPV negativo com recidiva) ($p=0,07$). A relação dos grupos com a sobrevida está demonstrada no gráfico 2.

ESTIMATIVA DE SOBREVIDA				
	Média	EP	χ^2	Log Rank P
HPV – Não recidiva	77,5	13,3	6,934	0,074
HPV – Recidiva	67,7	15,0		
HPV + Não recidiva	59,0	10,1		
HPV + Recidiva	39,7	8,0		

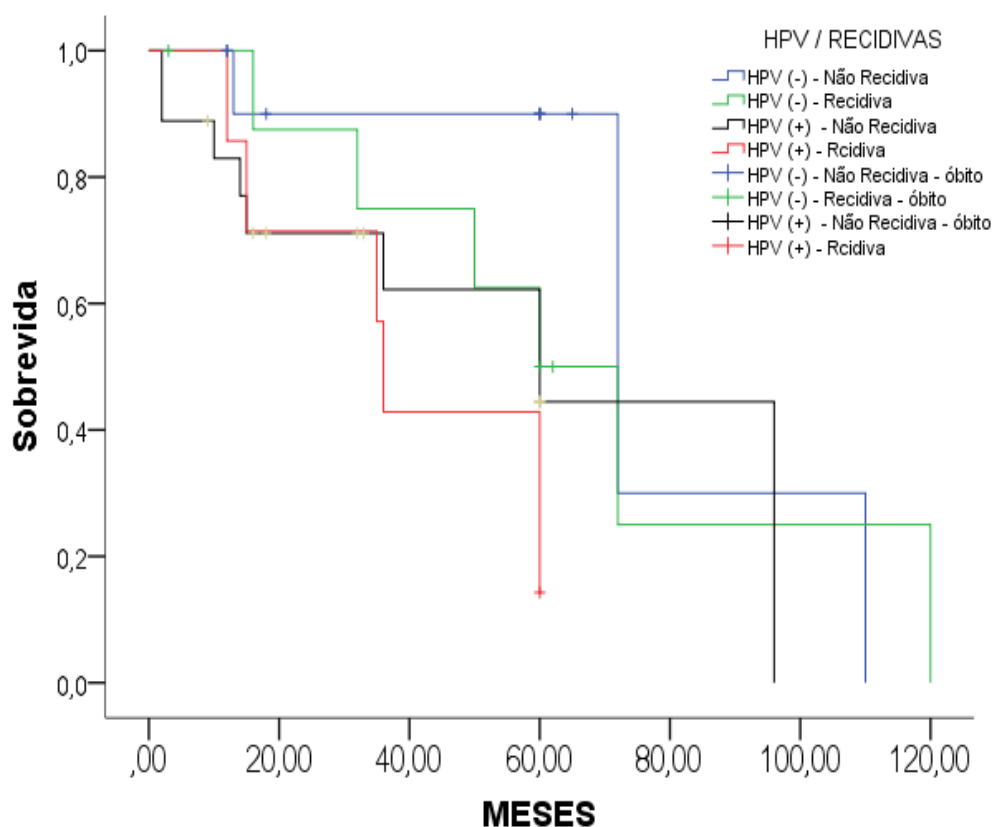


Gráfico 2. Curva sobrevida de Kaplan-Meier. Pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma de cavidade oral HPV positivo e HPV negativo, com e sem ocorrência de recidiva.

Correlacionamos os grupos HPV positivo estadio inicial e HPV negativo estadio inicial, em relação à metástase, recidiva, e desenvolvimento de segundo tumor durante o acompanhamento. Não houve diferença na evolução dos grupos quanto a estes aspectos clínicos. (Os resultados estão agrupados na tabela 10).

Tabela 10. Correlação HPV positivo estadio inicial com HPV negativo estadio inicial com variáveis clínicas.

		I e II						P
		N	HPV-		n	HPV+		
			% HPV- EC I e II	% TOTAL		% HPV+ EC I e II	% TOTAL	
METÁSTASE	Não	9	100,0%	18,4%	6	100,0%	12,2%	---
	Sim	0	0,0%	0,0%	0	0,0%	0,0%	
RECIDIVAS	Não	7	77,8%	14,3%	3	50,0%	6,1%	0,264
	Sim	2	22,2%	4,1%	3	50,0%	6,1%	
SEGUNDO	Não	7	87,5%	14,6%	6	100,0%	12,5%	0,369
TUMOR	Sim	1	12,5%	2,1%	0	0,0%	0,0%	
ACOMETIMENTO	N0	9	100,0%	18,4%	6	100,0%	12,2%	---
LINFO	N+	0	0,0%	0,0%	0	0,0%	0,0%	
ÓBITOS	Vivos	6	66,7%	12,2%	3	50,0%	6,1%	0,622
	Óbitos	3	33,3%	6,1%	3	50,0%	6,1%	

Nos grupos estadio avançado HPV positivo e HPV negativo também não houve diferença significativa quanto ao acometimento linfonodal e o desenvolvimento de segundo tumor. Recidivas foram mais frequentes em tumores HPV negativo ($p=0,028$). Para o grupo estadio avançado HPV positivo, 21,05% dos casos ($n=4$) sofreram recidivas, enquanto que 66,6% dos casos HPV negativo ($n=8$) sofreram recidivas. Metástases à distância ocorreram, predominante, nos casos HPV positivos, e todos foram a óbito. (Os dados estão agrupados na tabela 11). Em relação ao impacto do HPV no prognóstico

de tumores avançados, o índice de sobrevida foi maior em pacientes com tumores HPV negativo, como mostra o gráfico 3. Os tumores HPV positivo estadio avançado tiveram menor sobrevida, em relação aos demais grupos ($p=0,032$).

Tabela 11. Correlação HPV positivo estadio inicial com HPV negativo estadio inicial com variáveis clínicas.

		III e IV				P		
		N	HPV- % HPV- ECIII e IV	% TOTAL	n		HPV+ % HPV+ ECIII e IV	% TOTAL
METASTASE	NÃO	12	100,0%	26,5%	15	78,9%	34,7%	0,094
	SIM	00	0,0%	0,0%	04	21,0%	8,2%	
RECIDIVAS	NÃO	04	33,3%	10,2%	15	78,9%	32,7%	0,028
	SIM	08	66,6%	16,3%	04	21,1%	10,2%	
SEGUNDO TUMOR	NÃO	10	83,3%	22,9%	16	84,2%	37,5%	0,930
	SIM	02	16,7%	4,2%	03	15,8%	6,3%	
ACOMETIMENTO LINFO	N0	02	16,7%	4,1%	09	47,3%	18,4%	0,140
	N+	10	83,3%	22,4%	10	52,6%	24,5%	
ÓBITOS	Vivos	05	41,6%	12,2%	07	36,9%	16,3%	0,728
	Óbitos	07	58,4%	14,3%	12	63,1%	26,5%	

	ESTIMATIVA DE SOBREVIDA			
	Média	EP	χ^2	<i>P</i>
HPV – EC I e II	62,8	8,3	8,781	0,032
HPV – EC III e IV	75,2	12,8		
HPV + EC I e II	72,3	16,9		
HPV + EC III e IV	39,2	5,7		

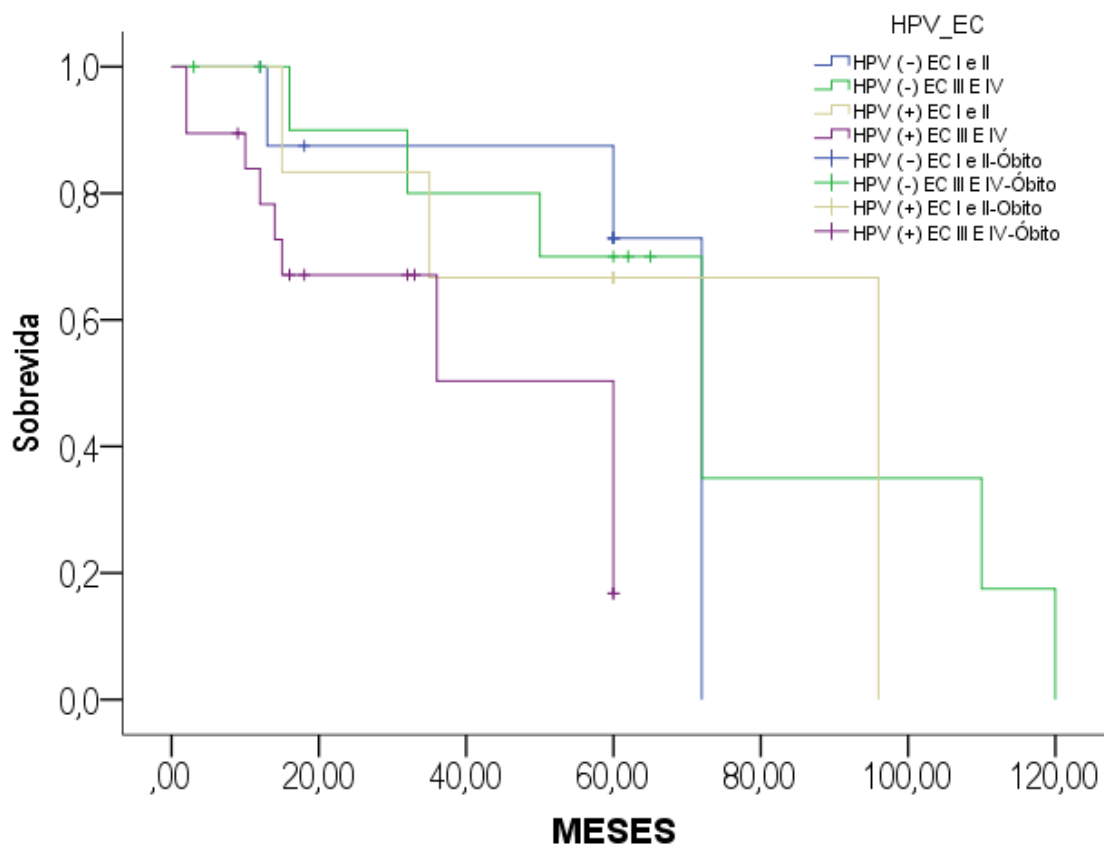


Gráfico 3. Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier. Pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma de cavidade oral, correlação sobrevivência com estado HPV negativo estágio inicial, estágio avançado e HPV positivo estágio inicial e avançado.

5 DISCUSSÃO

O câncer de cabeça e pescoço constitui um heterogêneo grupo de tumores, do qual o carcinoma de cavidade oral é o mais prevalente (IARC, 2014). No presente estudo, o grupo amostral foi composto por 46 casos de cavidade oral e apenas 3 tumores primários de orofaringe. As correlações clínicas e anatomopatológicas foram realizadas com os casos de carcinoma de cavidade oral, sendo que os 3 casos de orofaringe foram excluídos das análises, devido ao pequeno número de amostras.

De acordo com a literatura, a incidência de CECCO é maior em homens acima de 40 anos, sendo aproximadamente 1 caso feminino para cada 8 casos masculinos (IARC,2014). Nossos dados são semelhantes à literatura, pois obtivemos 4 casos femininos em nossa amostra, cerca de 1 caso para cada 10 casos masculinos. A idade dos pacientes variou de 37 a 73 anos de idade e a faixa etária média dos pacientes foi de 54 anos. A literatura há muito tempo relata a incidência de CECCO em indivíduos acima de 50 anos (MENDEZ et al, 2012; KANSY et al, 2013). Em um estudo realizado com dados de uma população brasileira, foi observado à ocorrência de CECCO em pacientes entre 61 a 70 anos de idade (DANTAS et al, 2015). Mais recentemente, tem se observado um aumento da incidência de lesões malignas orais em indivíduos com menos de 40 anos de idade (AYAZ et al, 2011). Isto também se observa em relação ao carcinoma de orofaringe (MARUR; FORASTIERE, 2008).

O tabagismo foi observado em 89% dos pacientes. O hábito de fumar é fator etiológico predominante para cânceres de cavidade oral e está relacionado com um a cada cinco casos de câncer em geral (HASHIBE et al, 2009; HOFFMANN et al, 2001). Em concordância com nossos resultados, em uma análise recente com 142 pacientes com CECCO e câncer orofaríngeo, a

prevalência de tabagismo foi de 86,2% (KOSLABOVA et al, 2013). A associação do tabaco com o câncer de cavidade oral também foi avaliada por WUNSCH-FILHO (2002), e seus dados concluíram que o tabagismo combinado com o aumento da idade eleva o risco de desenvolvimento das lesões malignas (WUNSCH-FILHO, 2002). Quanto ao etilismo, 76% dos pacientes possuem ou já possuíram o hábito de beber. Segundo a literatura, o risco de desenvolver CECCO aumenta 1,7 vezes com a exposição ao álcool uma ou duas vezes por dia. O consumo de três a quatro doses de álcool destilado diariamente aumenta o risco em 2,3 vezes, e a exposição a cinco ou mais doses por dia, eleva em 5,5 a chance de desenvolver CECCO (HUBER; TANTIWONGKOSKI, 2014).

Em relação à associação do etilismo ao tabaco, 72% dos pacientes fizeram ou ainda fazem o uso concomitante. A literatura enfatiza que etilistas e fumantes pesados, que fumam 25 ou mais cigarros por dia (WILSON et al, 1992), têm um risco aumentado de desenvolver câncer de CECCP. Maasland et al (2014) investigaram a associação entre o tabaco, etilismo e CECCP em um estudo de coorte com 120.852 participantes e 395 casos de carcinoma de cabeça e pescoço, e confirmaram que a interação entre o etilismo e o tabagismo é sinérgica para o risco de câncer de cabeça e pescoço (MAASLAND et al, 2014).

Quanto ao estadiamento clínico (EC), 32,6% dos pacientes (n=15) foram avaliados em estadio 1 e 2 e 67,4% (n=31) foram diagnosticados em estadio 3 e 4. De acordo com a literatura 15 a 30% dos pacientes de CECCP são diagnosticados com a doença no estadio inicial, e 60 a 80% apresentam a doença em estadio avançado (IARC, 2014; INCA, 2014; COPONIGRO et

al.,2009; JEMAL et al.,2007). No Brasil 73% dos pacientes com CECCP são diagnosticados no estadio T3 e T4, e em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, somente 37% dos pacientes são diagnosticados em estadio avançado (CARVALHO et al, 2004). O diagnóstico precoce tem impacto positivo na sobrevida. A literatura relata que pacientes com CECCP em estádios iniciais (T1 ou T2) têm um índice de sobrevida livre de doença em cinco anos que varia de 70 a 90%, e naqueles com estadios avançados (T3 e T4) os índices variam de 15 a 67% (MARUR; FORASTIERE, 2008). Os nossos dados estão em conformidade com a literatura, pois os pacientes diagnosticados em estadio inicial tiveram índice de sobrevida livre de doença estimado em 60%, enquanto os pacientes em estadio avançado tiveram índice de 38,7%. Esses dados reforçam a importância do diagnóstico precoce, bem como o impacto do estadiamento no prognóstico do paciente.

Segundo a literatura, o CECCO continua com uma baixa expectativa de sobrevida em 5 anos, que varia entre 40 e 50% (BELL et al, 2007; ROGERS et al., 2009; BAGAN et al, 2010; ALI et al., 2014). Em nossa amostra a sobrevida foi de 45,6%, condizendo com os dados da literatura.

Quanto ao acometimento linfonodal, 43,5% dos pacientes (n=20) apresentaram metástases regionais (N1-N3) no momento do diagnóstico, dados concordantes com a literatura, que evidencia comprometimento linfonodal ao diagnóstico em mais de 50% dos pacientes de CECCP (JEMAL et al, 2008; XING et al, 2015). Analisamos o impacto de metástases regionais no prognóstico, e a sobrevida em 60 meses para pacientes N+ foi de 35%, enquanto que para pacientes sem acometimento linfonodal foi de 60,9% (p=0,203). Apesar de não encontrar significância estatística, que pode ser

explicada pela amostra pequena, a diferença na sobrevida dos casos com e sem acometimento linfonodal é evidente. Segundo a literatura, estádios iniciais (T1-T2) de CECCO na maioria das vezes podem ser curados com cirurgia, no entanto, a ocorrência de metástase nodais fornece um mau prognóstico, e a expectativa de sobrevida é reduzida pela metade (SHAH et al, 1990; XING et al, 2015).

Foram observadas recidivas em 34,8% dos pacientes (n=16) durante o acompanhamento, e destes 75% (n=12) foram a óbito devido à neoplasia. A sobrevida em 5 anos na presença de recidiva foi de 25% e na ausência deste fator foi de 56,6%, sendo a diferença entre as curvas, estatisticamente significativa (p=0,04). Segundo a literatura, recidivas podem ser decorrentes de falhas no tratamento dos carcinomas de boca, como margens de ressecção comprometidas por lesão, e também por características histopatológicas, como infiltração perineural e infiltrado inflamatório peritumoral. As recidivas são frequentes em pacientes com doença em estágio clínico avançado 3 e 4, dentro dos primeiros dois anos após o tratamento (AMAR et al, 2003). Recidivas podem ocorrer devido à persistência do tumor que permanece quiescente ao longo do período ou uma segunda lesão, e são associadas a um pior prognóstico (AMAR et al, 2013), semelhante ao observado em nosso grupo amostral.

O desenvolvimento de segundo tumor foi observado em 13% dos casos (n=6). Este valor é superior a taxa de 9,1% observado por Jones et al (1995) em tumores de cabeça e pescoço. Porém, menor que a taxa de 15,5% apresentada por outro grupo em CECCP (JU, et al, 1964). Segundo a literatura, pacientes com câncer de cabeça e pescoço têm um elevado risco de

desenvolver segundos tumores, e as taxas podem variar em diferentes sítios anatômicos. Semelhante aos nossos resultados, um estudo relatou taxa de 16,3% de segundo tumores em carcinomas de cavidade oral. A literatura relata que segundos tumores em CECCO são mais frequentes quando o tumor está localizado na parte inferior da cavidade bucal (assoalho de boca, alvéolo inferior, ou triângulo retromolar), e geralmente ocorrem em 2 anos após o diagnóstico (MARCHETTA et al, 1965).

O desenvolvimento de um segundo tumor representa um pior prognóstico, e têm uma redução significativa da sobrevida. No entanto, em nossa amostra, apesar de não ser estatisticamente significativa, a sobrevida foi melhor nos casos com segundo tumor. Dos 6 pacientes em que se observou segundo tumor, somente 1 (16,6%) foi a óbito. Entre os pacientes sem desenvolvimento de segundo tumor 24 (60%) foram a óbito ($p=0,053$). Jones et al (1995) também não observaram diferença na sobrevida em 5 anos entre os grupos de CECCP com segundo tumor, e CECCP sem segundo tumor. No entanto, notaram maior índice de mortalidade em casos com segundo tumor, quando analisaram a sobrevida para 15 anos.

Durante o acompanhamento, metástases à distância foram observadas em 4 casos (8,7%) e todos foram a óbito. Segundo a literatura, 5% dos pacientes apresentam metástase à distância no momento do diagnóstico, enquanto que no decorrer da doença os índices podem variar entre 10 a 40% (TAKES et al., 2012). A ocorrência de metástase à distância fornece um mau prognóstico, e a taxa de sobrevida é calculada em aproximadamente 35% em 5 anos (SIEGEL, 2015).

5.1. ANÁLISE DE PREVALÊNCIA DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

As taxas de detecção do HPV em carcinomas de cavidade oral variam consideravelmente em todo mundo, sendo que a maioria dos estudos relatam taxas entre 25 a 80% (ZARAVINOS, 2014; KRUGER et al, 2014). No presente estudo 54% dos casos (n=25) apresentaram positividade para HPV. Nos Estados Unidos, o número de casos de câncer de cavidade oral e orofaringe associados ao HPV aumentaram 225% de 1988 a 2004, enquanto o número de tumores HPV negativo foi reduzido à metade (CHATURVEDI et al, 2011). A literatura relaciona o aumento acelerado da incidência de câncer de cavidade oral e orofaringe, a mudanças no perfil de comportamento sexual, histórico de verrugas genitais, primeira relação sexual precoce, favorecendo a exposição oral ao HPV (KREIMER et al, 2004; GILLISON et al, 2012).

Diversos estudos relataram HPV em CECCO e em carcinoma orofaríngeo. Os achados variam de baixa detecção, menos de 20% para carcinomas de cavidade oral e orofaringe (KAMINAGAKURA et al, 2012; SMITH et al, 2012; MAIER et al, 2013; RIBEIRO et al, 2011); taxas intermediárias, entre 20 a 30% (TEZAL et al, 2012; KLOZAR et al, 2013; LEE et al, 2013); e outros acima de 30% (JALOULI et al, 2012; CHEN et al, 2012; DURAY et al, 2012; KOSLABOVA et al, 2013), semelhante ao nosso resultado.

Divergências nas taxas do DNA do HPV observadas podem ser atribuídas não só às diferenças nas metodologias utilizadas para a detecção de HPV nos diferentes estudos, mas também as características socioeconômicas dos pacientes em estudo, incluindo práticas sexuais (WONG et al, 2014). A prevalência também pode diferir devido a diferentes sítios do tumor entre os

estudos, a maioria dos estudos disponíveis na literatura não analisa a prevalência do HPV na cavidade oral e orofaringe separadamente, sítios como a base de língua e outras regiões de orofaringe geralmente têm uma maior prevalência de infecção pelo HPV, em relação a cavidade oral (DESCAMPS et al, 2012; KRUGER et al., 2014; KANSY; THIELE; FREIER, 2014).

O HPV é reconhecido como um importante fator na carcinogênese de orofaringe e esta associação é responsável pelo aumento da incidência de câncer de orofaringe na maior parte do mundo (IARC, 2007). O aumento da incidência está ocorrendo principalmente em indivíduos sem fatores de risco ambientais, com idades entre 40 e 55 anos, e está associada à infecção persistente (CHATURVEDI et al, 2011).

A relação do HPV com o câncer de cavidade oral ainda é incerta (DESCAMPS, KRUGER et al, 2013), e a incidência deste grupo de tumores tem diminuído em países desenvolvidos (FRANCESCHI et al, 2000; STURGIS; CINCIPIRINI, 2007; PATEL et al., 2011; KANSY; THIELE; FREIER, 2014). Entretanto, no Brasil, a incidência de CECCO permanece elevada (CHATURVEDI et al, 2013).

Ao analisar os fatores prognósticos separadamente em pacientes com tumores HPV-negativos e HPV-positivos, não houve diferenças no tamanho do tumor (T) e acometimento linfonodal (N). O risco de morte foi maior para pacientes HPV positivo (60%), enquanto que o risco para pacientes HPV negativo foi estimado em (47,7%) ($p=0,025$). No que se refere à sobrevida geral, a maioria dos estudos concorda que pacientes com carcinoma orofaríngeo, infectados pelo HPV têm um melhor prognóstico (LICITRA et al, 2006; RAGIN; TAIOLI, 2007; RISCHIN et al, 2010; POSNER et al, 2011),

porém o prognóstico para carcinoma de boca associado ao HPV ainda é incerto (KRUGER et al., 2014; KANSY; THIELE; FREIER, 2014). No geral, a evidência para o papel do HPV no prognóstico de CECCO permanece fraca. Segundo a literatura, há uma necessidade de separação dos grupos heterogêneos dos carcinomas da cabeça e pescoço, para obter resultados válidos de ensaios futuros. Além disso, identificar os subtipos de HPV de alto risco por meio de um método de detecção padrão poderia contribuir para alcançar resultados comparáveis (DESCAMPS et al, 2012).

O melhor prognóstico para pacientes com tumores de orofaringe HPV positivo continua sem entendimento completo. (ZARAVINOS, 2014). É conhecido que tumores HPV positivo e HPV negativo exibem diferenças na biologia do tumor e, portanto, devem ser considerados dois distintos grupos com vias biológicas distintas: uma conduzida por agentes infecciosos e a outra por agentes ambientais. (LEEMANS et al, 2011; KRUGER et al, 2013). Tumores HPV positivos de cabeça e pescoço, geralmente não estão associados a fatores de risco ambientais (CHATURVEDI et al, 2011). Contudo, nossos dados são discordantes, e 92% dos pacientes eram tabagistas. Ainda, dados robustos têm demonstrado que o hábito de fumar pode modificar o comportamento clínico de CECCO HPV positivo, afetando adversamente o prognóstico dessas neoplasias (GRANATA et al, 2012).

O sistema atual de estadiamento apresenta limitações em prever prognóstico para pacientes com carcinoma de cavidade oral e orofaringe (CASIGLIA; WOO, 2001; FRAZIER et al, 2015). A literatura tem buscado marcadores que contribuam, dentre eles o HPV (KOSLABOVA et al, 2013). Comparamos os tumores HPV positivo estadio inicial com os tumores HPV

negativo estadio inicial, em relação a recidivas, metástase, e desenvolvimento de segundo tumor, mas não houve correlação estatística significativa. Em relação à sobrevida, o estado HPV positivo não teve influência no prognóstico de pacientes estadio I e II.

Analisamos também os fatores prognósticos para pacientes em estadio avançado HPV positivo e em pacientes HPV negativo. O tamanho do tumor (T) no momento do diagnóstico não diferiu entre os pacientes com CECCO HPV positivo e HPV-negativo. Não houve, também, diferenças no comprometimento linfonodal (N) entre os grupos. Em concordância com nossos dados, um estudo analisou 81 pacientes de câncer de boca e orofaringe HPV negativo e HPV positivo quanto à sobrevida e prevalência de metástase regional, e não houve diferença entre os grupos quanto ao comprometimento de linfonodos. Contudo os autores demonstraram melhora na sobrevida nos casos HPV positivo (AKK et al, 2010). Outras análises também não encontraram correlação do envolvimento ganglionar com a sobrevida de pacientes de CECCO e câncer orofaríngeo (STRAETMANS et al 2009; KLOZAR et al, 2013). O que sugere que metástases linfonodais são menos importantes na previsão do prognóstico dos tumores HPV-positivos do que os tumores HPV-negativos. Um estudo correlacionou o tumor de CECCP HPV positivo com uma tendência a apresentar envolvimento ganglionar avançado, no entanto observaram que tumores HPV positivo para pacientes N0 têm pior prognóstico que os pacientes com envolvimento de gânglios linfáticos (XING et al, 2015). Quando analisamos o acometimento linfonodal nos casos HPV positivo estadio avançado com HPV negativo estadio avançado também não houve correlação.

No que se refere a recidivas e desenvolvimento do segundo tumor, em relação ao estado HPV positivo e HPV negativo, não houve correlação estatística significativa. Quando comparamos os casos estadio avançado HPV negativo com estadio avançado HPV positivo, os tumores HPV positivo sofreram menos recidivas, sendo estatisticamente significativo ($p=0,028$). No entanto, a sobrevida para estes grupos não mostrou resultados significativos, o índice de mortalidade foi maior em pacientes HPV positivos, 63% em comparação com 58,8% em pacientes HPV negativos estadio avançado. A piora da sobrevida dos tumores HPV positivos pode ser devido ao fato de que em nossa amostra os casos com metástase à distância só ocorreram em pacientes com tumores HPV positivo.

A maioria dos estudos concorda que eventos como recidivas e segundo tumor primário, ocorrem com menos frequência em tumores HPV-positivos (LICITRA et al, 2006; RISCHIN et al, 2010; KLOZAR et al, 2013). Assim como em nosso estudo, HAFKAMP et al (2008) correlacionaram o estado HPV positivo com dados clínicos, e notaram menores taxas de recidivas e segundo tumor primário em tumores HPV positivo (HAFKAMP et al, 2008). Outro estudo também observou uma diferença significativa na taxa de recidiva. As taxas de recorrência nos casos de HPV negativo e HPV-positivo foram 37% e 18%, respectivamente (KLOZAR et al, 2013). ROSENQUIST et al observaram, maiores taxas de recidivas e segundo tumor primário em tumores HPV positivo estadio avançado, sugerindo que o estadio do tumor têm forte relação com o risco de recorrência e segundo tumor primário (ROSENQUIST et al, 2009). Comparando a ocorrência de metástase à distância, notamos que nenhum

caso HPV negativo sofreu metástase, enquanto que todas observadas ocorreram em casos HPV positivos estadio avançado.

A dificuldade em prever o comportamento clínico do CECCO, a recidiva local, e a baixa expectativa de sobrevida (CARVALHO et al, 2004), são fatores que estimulam a busca por maior conhecimento dos tumores de cavidade oral. Em estudos anteriores, verificou-se que diferenças na biologia do tumor de casos HPV-positivo e HPV-negativo podem ter implicações para o tratamento dos pacientes (LEEMANS et al, 2011). A coleta de dados de pacientes e análises dos fatores prognósticos e moleculares associados à infecção por HPV poderá ajudar a melhorar a avaliação de risco e desenvolvimento de CECCO, bem como fornecer ferramentas para direcionar o tratamento específico em cada caso (XING et al, 2015). Para melhorar as estratégias de tratamento para pacientes com CECCO, é essencial encontrar marcadores moleculares que determinem os subgrupos de CECCO, mesmo que em biópsias. Na literatura, a perda do p16 está associada a um pior prognóstico. (SMITH et al., 2008, SHAH et al., 2009, GROBE et al., 2013). Aproximadamente 80% dos CECCP mostram inativação de p16, como um resultado de alterações genéticas neste gene supressor de tumores gene (REED et al, 1996; HAYES; Van WAES; SEIWERT, 2015). O comportamento biológico dos tumores HPV positivos também estimulam a busca por novas terapias. Os anticorpos monoclonais vêm adquirindo cada vez mais importância na clínica oncológica. Atualmente, novas drogas imunoterápicas têm emergido. Os tumores HPV positivo tem sido alvo de investigação, na perspectiva de tratamento seletivo. Atualmente existem trials clínicos com imunoterapia baseada em antígenos específicos de tumor (Cancer testis) em pacientes com

tumores de cabeça e pescoço HPV positivo e clinicamente irressecáveis (VOSKENS, et al, 2012).

Estudos realizados recentemente têm aumentado as evidências de que o HPV, especialmente o subtipo HPV16, desempenha um papel importante na etiologia do carcinoma de células escamosas na região da cavidade oral, da faringe e da laringe (KLUSSMANN et al, 2001; KREIMER et al, 2005; MARUR et al, 2010). Nosso estudo apresentou algumas limitações, como amostra pequena e o fato das análises de genotipagem dos casos de HPV positivo não terem sido realizadas.

Por enquanto a prevenção primária parece ser a estratégia mais importante para o controle da doença. A relação causal, bem estabelecida, entre a infecção por HPV e o desenvolvimento de câncer de colo do útero levou ao desenvolvimento de vacinas preventivas (HAUSEN, 2009). Existem duas vacinas disponíveis nos EUA e no Brasil contra o HPV de câncer de colo de útero, ambas para prevenir contra subtipos 16 e 18, e uma também abrange os tipos 6 e 11, que causam verrugas genitais (Centers for Disease, Control and Prevention, 2009). Estas vacinas tem 98% de eficácia contra lesões cervicais (KJAER, 2009), no entanto, ainda não se sabe se a vacinação previne a infecção de HPV oral (RETTIG, 2015). A ênfase na prevenção do tabagismo e etilismo permanece como fator fundamental em relação ao câncer oral.

6. CONCLUSÃO

- A prevalência de HPV em carcinoma epidermóide de cavidade oral foi de 54,3% (25/46).

- Os fatores clínicos: recidiva, segundo tumor primário e metástases à distância tiveram impacto negativo na sobrevida.

- A correlação dos tumores HPV positivo com os dados clínicos e histopatológicos mostrou-se estatisticamente significativa quanto a:

- A sobrevida global foi maior em tumores HPV negativos;

- Entre tumores estadios avançado (ECIII e EC IV) as recidivas foram mais frequentes em tumores HPV negativos.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAR, A. et al. Valor prognóstico da metástase regional no carcinoma epidermoide de língua e soalho bucal. *Braz. j. otorhinolaryngol.*, v. 79, n. 6, 2013.

AGRA, I. M. Recidiva local de carcinomas epidermóides da boca e orofaringe: estudo de variáveis anatomopatológicas e de marcadores biológicos associados ao prognóstico em pacientes submetidos a cirurgia de resgate. *Radiol Bras*, v. 40, n.5, 2007.

ALNUAIMI, A. D. et al. Oral Candida colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study. *Oral Oncol.*, v. 51, n. 2, p. 139-145, 2015.

ANG, K. K. et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. v. 363, n. 1, p-24-35, 2010.

ASSLABER, M., ZATLOUKAL, K. Biobanks: transnational, European and global networks, *Briefings in Functional Genomics and Proteomics*, v. 6, n. 3, p. 193-201, 2007.

AYAZ, B. et al. A clinico-pathological study of oral cancers. *Biomedica*, v.27, p.29-32, 2011.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*, v.46, n. 6, p. 414-417, 2010.

BELL, R. B. et al. Tongue cancer: is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? *J Oral Maxillofac Surg*, v.65, n.2, p. 229-236, 2007.

BENSON, E.; LI, R.; EISELE, D.; FAKHRY, C. The clinical impact of HPV tumour status upon head and neck squamous cell carcinomas. *OralOncol.*, v. 50, n. 6, p. 565-574, 2013.

BRENNAN, J. A.; SIFRANSKY, D. Molecular staging of head and neck squamous carcinoma. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 15, n. 1, p. 3-10, 1996.

BRENTANI, H. et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. *Proc Natl AcadSci USA*, v. 100, n. 23, p. 13418-13423, 2003.

Cancer Genome Atlas Network: Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*, v. 517, p. 576-582, 2015.

CAPONIGRO, F.; LONGO, F.; PERRI, F.; IONNA, F. Docetaxel in the management of head and neck cancer. *Anti-Cancer Drugs.*, v. 20, p. 639-645, 2009.

CARVALHO, A. L.; NISHIMOTO, I. N.; CALIFANO, J. A.; KOWALSKI, L. P. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United

States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer.*, v. 114, n. 5, p. 806-816, 2005.

CASIGLIA, J.; WOO, S. A comprehensive review of oral cancer. *Gen Dent.*, v. 49, p. 72–82, 2001.

CAPACCIO, P. et al. Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes. *Head Neck*, v. 22, n. 3, p. 234-240, 2000.

Centers for Disease, C and Prevention. FDA licensure of bivalent human papillomavirus vaccine (HPV2, Cervarix) for use in females and updated HPV vaccination recommendations from the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP) *MMWR Morb Mortal Wkly*, v. 59, n.20, p. 626–629, 2010.

Centers for Disease, C and Prevention. Recommendations on the use of quadrivalent human papillomavirus vaccine in males—Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2011; v. 60, n. 50, p. 1705–1708, 2011.

CHANG, T. S. et al. Impact of young age on the prognosis for oral cancer: a population-based study in Taiwan. *PLoS One*, v. 8, n. 9, 2013.

CHATURVEDI, A. K. et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*, v. 29, p. 4294-4301, 2011.

CHATURVEDI, A. K. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol*, v. 6, p.16–24, 2012.

CHATURVEDI, A. K. et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*, v. 31, n. 36, p. 4550-4559, 2013.

CHEN, Y. W.; KAO, S. Y, YANG, M. H. Analysis of p16(INK4A) expression of oral squamous cell carcinomas in Taiwan: prognostic correlation without relevance to betel quid consumption. *J Surg Oncol*, v. 106, p. 149-154, 2012.

DANTAS, T. S. et al. Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. *Medicine*, v.95, n.3, p. 2314-2319, 2016.

DESCAMPS, G.; WALTIEZ, R.; SAUSSEZ, S. Proteomic study of HPV-positive head and neck cancers: preliminary results. *Biomed Res Int.*, 2014.

DESCAMPS, G. et al. Detection and quantification of human papillomavirus in benign and malignant parotid lesions. *Anticancer Res*, p. 32, n.9, 3929-3932, 2012.

DE VILLIERS, E. M. et al. Classification of papillomaviruses. *Virology*, v. 324, p. 17-27, 2004.

D'SOUZA, G. et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, v.356, n.19, p. 1944-1956, 2007.

DURAY, A. et al. Human papillomavirus DNA strongly correlates with a poorer prognosis in oral cavity carcinoma. *Laryngoscope*, v. 122, p.1558-1565, 2012.

EDGE, S. B.; COMPTON, C. C. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann SurgOncol.*, v. 17, n. 6, p. 1471-1474, 2011.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, v. 136, n. 5, p. 359–386, 2015.

FERREIRA ANTUNES, J. L. et al. Joint and independent effects of alcohol drinking and tobacco smoking on oral cancer: a large case-control study. *PLoS One*, v. 8, n.7, 2013.

FORASTIERE, A.; KOCH, W., TROTTI, A.; SIDRANSKY, D. Head and neck cancer [published correction appears in *N Engl J Med*. 2002; 346(10):788]. *N Engl J Med.*, v. 345, n. 26, p. 1890-1900, 2001.

FORBES, S. A. et al. The catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC).*CurrProtoc Hum Genet.*, v. 57, p. 10.11.1–10.11.26, 2008.

FRANCESCHI, S. et al. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: Etiological clues. *Oral Oncol*, v. 36, p.106–115, 2000.

FRAZIER, J. J.; STEIN, C. D.; TSEYTLIN, E.; BEKHUIS, T. Building a gold standard to construct search filters: a case study with biomarkers for oral cancer. *J Med Libr Assoc.*, v. 103, n. 1, p. 22-30, 2015.

GENTLEMAN, R. C. et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.*, v. 5, R80, 2004.

GILLISON, M. L. 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*, v.100, n.6, p.40-420, 2008.

GILLISON, M. L. et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA.*, v. 307, n.7, p.693-703, 2012.

GILLISON, M. L. et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine*, v. 30, p.34-45, 2012.

GRANATA, R. et al. Tumor stage, humanpapillomavirus and smoking status affect the survival of patients with oropharyngeal cancer: an Italian validation study. *Ann Oncol*, v. 23, n. 1832-1837, 2012.

GRCE, M.; MRAVAK-STIPETIC, M. Human papillomavirus–associated diseases. *Clinics in Dermatology*, v. 32, p. 253–258, 2014.

GREENE, F.L. et al. *AJCC Cancer Staging Handbook*, 6th ed., New York: Springer; 2002.

GUPTA, B.; JOHNSON, N. W. Systematic Review and Meta-Analysis of Association of Smokeless Tobacco and of Betel Quid without Tobacco with Incidence of Oral Cancer in South Asia and the Pacific. *PLoS One*, v. 9, n. 11, 2014.

HAFKANP, H. C. et al. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer*, V.122, p. 2656–2664, 2008.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011.

HARDISSON, D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, v. 260, p. 502-508, 2003.

HAYES, D. N.; Van WAES, C.; SEIWERT, T. Y. Genetic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer and Comparison to Tobacco-Related Tumors. *J Clin Oncol.*, v. 33, n. 29, p. 3227-3234, 2015.

HARRIS, S. L. et al. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head Neck*, v.33, p.1622–1627, 2011.

HASHIBE, M. et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.*, p. 541-550, 2009.

HANSSON, K. et al. “Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden,” *Acta Oto-Laryngologica*, v. 125, n. 12, p. 1337–1344, 2005.

HENNESSEY, P. T.; WESTRA, W. H; CALIFANO, J. A. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res.*, v. 88, p. 300-306, 2009.

HERRERO, R. et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.*, v. 95, n. 23, p. 1772-1783.

HOBBS C. G. et al. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*, v. 31, n. 259–266, 2006.

HOFFMANN, Dietrich; HOFFMANN, Ilse; EL-BAYOUMY, Karam. The less harmful cigarette: a controversial issue. A tribute to Ernst L. Wynder. *Chemical research in toxicology*, v. 14, n. 7, p. 767-790, 2001.

HOCKING, J. S.; STEIN, A.; CONWAY, E. L. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br J Cancer.*, v. 104, p. 886–891, 2011.

HONG, A. M. et al. Squamous cell carcinoma of the oropharynx in Australian males induced by human papillomavirus vaccine targets. *Vaccine*, v. 28, n.19, p. 3269-3272, 2010.

HOOPER, S. J.; WILSON, M. J.; CREAN, S. J. Exploring the link between microorganisms and oral cancer: a systematic review of the literature. *Head Neck*, v. 31, p. 1228–1239, 2009.

HUBER, M. A., TANTIWONGKOSKI, B. Oral and oropharyngeal cancer. *Med Clin North Am*, v. 98, n.6, p. 1299-321, 2014.

HUBBERS, C. U.; AKGUL, B. HPV and cancer of the oral cavity. *Virulence*, v. 6, n. 3, p. 244-248, 2015.

IARC. Human papillomaviruses-IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon: International Agency for Research on Cancer, v.90, 2007.

IARC. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.

Instituto Nacional do Câncer (Brasil). Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: URL: <http://www.inca.org.br>.

Instituto Nacional do Câncer (Brasil). ABC do câncer. Rio de Janeiro, 2011.

INTERNACIONAL HUMAN PAPILLOMAVIRUS REFERENCE CENTER, 2016.

JALOULI, J. et al. Human papilloma virus, herpes simplex virus and epstein barr virus in oral squamous cell carcinoma from eight different countries. *Anticancer Res*, v.32, n.2, p.571-580, 2012.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; THUN, M. J. Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.*, v. 57, p. 43-66, 2007.

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, v. 58, p.71-96, 2008.

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. *CA Cancer Journal for Clinicians*, v. 61, n. 2, p. 69–90, 2011.

JOHNSON, N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.*, v. 65, p. 328–339, 2001.

JU, D. M. C. A study of the behavior of cancer of the head and neck during its late and terminal phases. *Am JSurg* 1964; 108:552-7.

JONES, A. S. Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, v.75, n.6, 1343-1353, 1995.

KAMINAGAKURA, E. et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int J Cancer*, v.130, n.8, p.1726-1732, 2012.

KANSY, K.; THIELE, O.; FREIER, K. The role of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma: myth and reality. *Oral Maxillofac Surg.*, v. 18, p. 165–172, 2014.

KALYANKRISHNA, S.; GRANDIS, J. R. G. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *JClinOncol.*,v. 24, n. 17, p. 2666-2672, 2006.

KHAN, Z.; TONNIES, J.; MULLER, S. Smokeless Tobacco and Oral Cancer in South Asia: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Journal of Cancer Epidemiology*, v. 2014, 2014.

KEARNEY, et al. Salvage Resection for Isolated Local and/or Regional Failure of Head/Neck Cancer Following Definitive Concurrent Chemoradiotherapy Case Series and Review of the Literature. *McGill J Med.*, v. 13, n, 2, p.29, 2011.

KJAER, S. K. et al. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res*, v. 2, n. 10, p. 868–878, 2009.

KLETER, B. et al. Development and clinical evaluation of a highly sensitive PCR-reverse hybridization line probe assay for detection and identification of anogenital human papillomavirus. *J ClinMicrobiol.*, v. 37, n. 8, p. 2508-2517, 1999.

KLOZAR, J. et al. Nodal status is not a prognostic factor in patients with HPV-positive oral/oropharyngeal tumors. *Journal of Surgical Oncology*, v. 107, p. 625–633, 2013.

KOSLABOVA, E. Markers of HPV infection and survival in patients with head and neck tumors. *Int J Cancer.*, v.133, n. 8, p.1832-1839, 2013.

KREIMER, A. R. et al. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet.*, v. 382, n. 9895, p. 877-887, 2013.

KRUGER, M. et al. The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: a retrospective analysis of 88 patients and literature overview. *J Craniomaxillofac Surg.*, v. 42, n. 7, p. 1506-1514, 2014.

KURDGELASHVILI, G. et al. Incidence of potentially human papillomavirus-related neoplasms in the United States, 1978 to 2007. *Cancer*, v. 119, p. 2291-2299, 2013.

LEE, L. A. et al. Increasing rates of lowrisk human papillomavirus infections in patients with oral cavity squamous cell carcinoma: association with clinical outcomes. *J Clin Virol*, v. 57, p.331-337, 2013.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.*, v. 11, p. 9-22, 2011.

LEWIS, J. S. et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol*, v. 34, n. 8, p.1088–1096, 2010.

LEWIS, J. S. et al. p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*, v. 6, p.75–82, 2012.

LICITRA, L. et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, v. 24, p. 5630-5636, 2006.

MA, J. et al. Induction chemotherapy in patients with resectable head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *World Journal of Surgical Oncology*, v. 11, n. 67, 2013.

MAASLAND, D. H. et al. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*, v. 14, p. 187, 2014.

MAIER, M. et al. Human papillomavirus in squamous cell cancer of the head and neck. A study at the Ulm Military Hospital, Germany. *HNO*, v. 61, p. 593-601, 2013.

MARCHETTA, F.C. et al. Multiple malignancies in patients with head and neck cancer. *Am J Surg*, v. 110, p.537-541, 1965.

MARUR, S.; FORASTIERE, A.A. Head and Neck Cancer: Changing Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin.Proc.*, v. 83, p. 489-501, 2008.

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

MASEREJIAN, N. N. et al. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. In: Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology, v. 15, p. 774–781, 2006.

MENDES, M. et al. A 10-year study of specimens submitted to oral pathology laboratory analysis: lesion occurrence and demographic features. *Bras Oral Res*, v. 26, p.235-241, 2012.

MEURMAN, J. H. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. *OralOncol.*, v. 46, p. 411–413, 2010.

MORTEL, C. G. et al. Multiple primary malignant neoplasms, III. *Cancer*, 61, p.238-248, 1961.

MORK, J. et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, v.344, n. 15, p.1125-1131, 2001.

NATIONAL COMPREHENSIVE CANCER NETWORK, 2015.

PATEL, S. C. et al. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 55, n. 4, p. 242-258, 2005.

PATEL, S. C. et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J ClinOncol.*, v. 29, n. 1, p. 1488–1494, 2011.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. *CA: Cancer J Clin.*, v. 55, p. 74–108, 2005.

PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. *Oral Oncol.*, v. 45, p. 350-350, 2009.

POSNER, M. R. et al. Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial. *Ann Oncol*, v.22, p. 1071-1077, 2011.

PRATHEEPA, L. et al. Expression of emerging novel tumor markers in oral squamous cell carcinoma and their clinical and pathological correlation to determine the prognosis and usefulness as a therapeutic target: a systematic review. *J Natural Sciences Res.*, v. 2, n. 1, 2012.

PRIANTE, A.V et al. Second primary tumors in patients with head and neck cancer. *Curr Oncol Rep*, v.13, n.2, p.132-139, 2011.

PRINGLE, G. A. The role of human papillomavirus in oral disease. *Dent Clin North Am.* v. 58, n. 2, p. 385-399, 2014.

RAGIN, C.C.; 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.*, v.121, p. 1813-1820, 2007.

REED, A. L. et al. High frequency of p16 (CDKN2/ MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.*, v. 56, n. 16, p. 3630-3633, 1996.

RETTIG, E.; KIESS, A. P.; FAKHRY, C. The role of sexual behavior in head and neck cancer: implications for prevention and therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.*, v.15, n.1, p.35-49, 2015.

RIBEIRO et al. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol*, v. 40, p. 489-502, 2011.

RISCHIN, D. et al. Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *J Clin Oncol*, v.28, p.4142-4148, 2010.

ROBINSON, M. et al. Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing. *Oral Oncol*, v. 46, n.7, p. 492–496, 2010.

ROGERS, S. N. et al. Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral Oncol.*, v. 45, p. 201–211, 2009.

ROGERS, S. N. et al. 'What will I be like' after my diagnosis of head and neck cancer? *Eur Arch Otorhinolaryngol.*, v. 272, n. 9, p. 2463-2472, 2015.

ROSENQUIST, J. et al. "Recurrence in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: human papillomavirus and other risk factors," *Acta Oto-Laryngologica*, v. 127, n. 9, p. 980–987, 2007.

SAND, L.; JALOULI, J. Viruses and oral cancer. Is there a link? *Microbes Infect.*, v. 16, n. 5, p. 371-378, 2014.

SAHU, N.; GRANDIS, J. R. New advances in molecular approaches to head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Drugs*, v. 22, p.656-664, 2011.

SAULLE, R. et al. Human papillomavirus and cancerous diseases of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.*, v. 21, n. 4, p. 417-431, 2015.

SCHACHE, A. G. et al. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res*, v. 17, n.19, p. 6262–6271, 2011.

SCHELECHT, N. F. et al.. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod Pathol*, v. 24, n. 10, p. 1295–1305., 2011.

SCHWARTZ, S. M. et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.*, v. 90, n. 21, p. 1626-1236, 1998.

SHAH, J. P.; CANDELA, F. C., PODDAR, A, K. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer.*, v. 66, p. 109-113, 1990.

SHAH, J. *Head and neck surgery and oncology*. Edinburgh: Mosby; 2003.

SIEGEL, R. L. et al. *Cancer statistics, 2015*. CA: a cancer journal for clinicians, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.

SINGUI, A. D.; WESTRA, A. D. 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*. v. 116, n. 9, p. 2166–2173, 2010.

SMEETS, S. J. et al. Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene*, v. 25, n.17, p. 2558–2564, 2006.

SMITH, E.M. et al. Complex etiology underlies risk and survival in head and neck cancer human papillomavirus, tobacco, and alcohol: a case for multifactor disease. *J Oncol*, p. 571-862, 2012.

STRAETMANS, J. M. et al. Human papillomavirus reduces the prognostic value of nodal involvement in tonsillar squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*, v.119, p. 1951–1957, 2009.

STURGIS, E. M.; CINCIPIRINI, P. M. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*, v. 110, n.7, p. 1429–1435, 2007.

SUBAPRIYA, R. et al. Assessment of risk factors for oral squamous cell carcinoma in Chidambaram, Southern India: a case–control study. *Eur J Cancer Prev.*, v. 16, n. 3, p. 251-256, 2007.

STRAUSBERG, R. L.; SIMPSON, A. J.; WOOSTER, R. Sequence-based cancer genomics: progress, lessons and opportunities. *Nat Rev Genet*, v. 4, n. 6, p. 409-418, 2003.

TAKES, R P et al. Distant metastases from head and neck squamous cell carcinoma.Part I. Basic aspects.*Oral Oncology*, v. 48, n. 9, p.775-779, set. 2012.

TEZAL, M.; GROSSI, S. G.; GENCO, R. J. Is periodontitis associated with oral neoplasms? *J Periodontol.*, v. 76, p. 406–410, 2005.

TEZAL, M. et al. Local inflammation and human papillomavirus status of head and neck cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 138, n. 7, p. 669-675, 2012.

TOTAT J. E. et al. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Prev Med*, v. 53, p., 12–21, 2011.

UKPO, O. C. et al. High risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* , v. 35, p. 1343–1350, 2011.

UPRETI, D.; PHATAK, A.; KUNG, S. K. Lentiviral vector-based therapy in head and neck cancer. *Oncology Letters*, v. 7, n. 1, p. 3–9, 2014.

VELLY, A. M. et al. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. *Oral Oncol.*, v. 34, p. 284-291, 1998.

VOSKENS, C. J. et al. Induction of MAGE-A3 and HPV-16 immunity by Trojan vaccines in patients with head and neck carcinoma. *Head Neck*, v. 34, n.12, p.1734-1746, 2012.

XING, Y. et al. Relation between the level of lymph node metastasis and survival in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer*, v. 122, n. 4, p.534-545, 2016.

WALLINE, H. M. et al. High-risk human papillomavirus detection in oropharyngeal, nasopharyngeal, and oral cavity cancers: comparison of multiple methods. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.*, v. 139, n. 12, p. 1320-1327, 2013.

WANG, W.; YANG, Y.; ZHANG, W.; W. U, W. Association of tea consumption and the risk of oral cancer: a meta-analysis. *Oral Oncol.*, v. 50, n. 4, p. 276-281, 2014.

WARD, M. J. et al. Staging and treatment of oropharyngeal cancer in the human papillomavirus era. *Head Neck*, v. 37:1002-1013, 2015.

WEIR, B. A. et al. Characterizing the cancer genome in lung adenocarcinoma. *Nature*, v. 450, p. 893–898, 2007.

WILSON, D. et al Characteristics of heavy smokers. *Prev Med*, v.21, n.3, 311-319, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence , Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.

WUNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol.* V.38, p. 737–746, 2002.

YAO, Q. W. et al. Association of periodontal disease with oral cancer: a meta-analysis. *Tumor Biol.*, v. 35, n.7, p. 7073-7077, 2014.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat RevCancer.*, v. 2, n. 5, p. 342-350, 2002.

ZARAVINOS, A. An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. *Oncotarget.*, v.5, n.12, p. 3956-3969, 2014.