

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Michelle de Oliveira e Silva

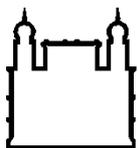
Avaliação do efeito do Papilomavírus Humano (HPV) no risco do câncer de cabeça e pescoço

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

RIO DE JANEIRO

2012



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

MICHELLE DE OLIVEIRA E SILVA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) NO RISCO DO
CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**

ORIENTADORA: Prof. Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

Aprovada em

EXAMINADORES:

Dr. Sergio Koifman (Presidente)

Dr. José Eduardo Levi

Dra. Patricia Savio de Araujo Souza

Dra. Claudia Esther Alicia Rocio Hassan

Dra. Ilce Ferreira da Silva

Rio de Janeiro, 18 de outubro de 2012.

Dedico esta tese ao Biel,
meu companheiro e amigo.

Agradecimentos

Em especial, a todos os pacientes que consentiram participar deste estudo, principalmente àqueles submetidos à biópsia.

Aos órgãos financiadores desse projeto: Instituto Oswaldo Cruz e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD).

À minha estimada orientadora, Dra. Cibele Bonvicino, pela confiança em minhas propostas e imensas colaborações para este estudo. Obrigada pela amizade, carinho (exceto por alguns surtos pela minha rebeldia) e aprendizados de que a vida é dura, e que pessoas azarentas também podem ter muita sorte.

À preciosa colaboração da Dra. Rocio Hassan, às grandes ideias para a tese e também pelas oportunidades que me proporcionaram amadurecimento pessoal e acadêmico. Será um grande prazer continuar essa caminhada mais próxima de você.

Ao Dr. Victor Perrusi, um admirável médico que tive o prazer de conhecer em uns dos momentos decisivos deste projeto. A realização deste estudo não teria sido possível sem sua extraordinária colaboração.

Ao amigo e primoroso pesquisador Dr. Mário Barros, pela paciência, atenção e bom humor durante todo o período de trabalho juntos em Berlim. Obrigada também pela amizade e confiança de cuidar da sua (e agora também um pouco nossa), querida Filó.

Ao Prof. Dr. Gerald Niedobitek, pela orientação no programa de doutorado-sanduíche pelo DAAD e por me acolher tão bem no seu laboratório em Berlim. Grata pelos seus ensinamentos e pela oportunidade de trabalhar com sua equipe, em especial Pam, Franzi, Johannes e Mário pelos agradáveis momentos juntos. Às demais queridas colegas, Anka, Katia, Gabi, Patricia e Bine com suas ‘mãos de fada’ para fazer lâminas de TMA.

À gentileza do Dr. Roberto Arcuri nas adoráveis tardes que passamos juntos para revisão dos casos. Guardarei para sempre os ensinamentos desses momentos em que tive o prazer de ouvir bons conselhos e agradáveis histórias.

À estimada amiga, colaboradora e admirável pesquisadora Dra Ilce Ferreira, pelo auxílio nas análises estatísticas realizadas em agradáveis cafés pela cidade do Rio de Janeiro e Vitória. Obrigada imensamente também pela profunda revisão da tese em tempo recorde, assim como pelas excelentes sugestões para o texto.

Ao Dr. Sérgio Eduardo Vianna, coordenador de ensino e pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO), e à Marisa Peter, pela colaboração para a realização das entrevistas e coletas de material do grupo controle deste estudo.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares e Carlos Ferreira Nascimento, do Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo, São Paulo pela colaboração na montagem dos TMA's.

À Dra. Maria Theresa Accioly pelo ótimo trabalho realizado na DIPAT/ INCA.

Ao Serviço do Banco Nacional de Tumores (BNT/ INCA), em especial ao Dr. Claudio Gustavo Stefanoff e Luciana por todo apoio.

À enfermeira Lorena Mota pela colaboração na coleta dos dados no INTO.

Ao admirável apreço à pesquisa da enfermeira Maria Cristina dos Santos pela colaboração prestada através de convites e entrevistas dos pacientes do Instituto Nacional de Câncer (INCA).

Aos prezados pesquisadores Dr. Sérgio Koifman, Dr. Eduardo Levi, Dra. Patrícia Sávio, Dra. Rocio Hassan e Dra. Ilce Ferreira por aceitarem tão prontamente participar desse momento especial da minha formação científica.

À prezada Dra. Rosalina Koifman e às queridas Vanessa e Sabrina, do Laboratório de Epidemiologia do Câncer.

Ao Dr. Miguel Moreira pelo apoio e oportunidade de trabalharmos juntos.

À Dra. Alcina Nicol pela confiança.

À querida amiga e aluna Camila Lordello pelos agradáveis momentos de bancada e enorme contribuição no projeto de HPV em amostras cervicais.

Aos queridos Ketiuce Zukeram, Renata Moraes e Sérgio Amaro que contribuíram para este trabalho.

Aos amigos que sempre estiveram por perto: Paulo Amoretty e família, Robão e Lurdinha, Camila Mazzoni e Tim Januschowski, Flavinha e tia Íria, Marion e Rafa, Alan, Saori e Kei, Samira, Carol Bassul, Fê Pedone e Adriano, Carol Furtado, Michel e Raíssa. Aos queridos amigos do laboratório Fabis (Knackfuss, Germano e Caramaschi), Tati Vaz, Maria Carol, Rodrigo, Raquel da Hora, Leila, Dri, Camila, Priscila, Cíntia, Ana Lazar, Albert, Kelly, João, Valdimara e tantos outros.

À amiga Jutta, pela alegria da sua agradável presença.

Agradeço a todos da nossa família sempre em pensamento: minhas queridas avós, Gelva, Iracema e Gerlinda. Ao vovô Chico com saudades. Aos meus queridos pais, Mirtes e Renê, e irmãos Manu e Mi (com a Lalá quase chegando) por todo amor. Ao meu cunhado Fábio por cuidar tão bem das meninas. Aos meus queridos Adelson, Jô, Nina e Mari, por estarem sempre presentes. À adorável tia Cristina, Pedro e Paulo, à tia Nair, Gelvinha e Iuji. À tantos outros araxaenses, campo-grandenses, capixabas, leopoldinenses, palmenses e uberabenses.

Ao seletto time que constitui meu ‘Norte’, Renata Beatriz, tia Sandra e tio Renair.

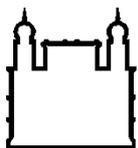
Em especial ao Biel, por compartilhar comigo uma vida cheia de alegria e amor. Por me mostrar caminhos mais suaves para seguir. E por dividir experiências tão profundas. Que possamos provar mais surpresas!

E que eu possa aprender cada dia mais com cada um de vocês!

...as pessoas podem transformar radicalmente
seus comportamentos ou suas crenças desde que
estejam diante do estímulo certo.

The tipping point.

Malcolm Gladwell



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

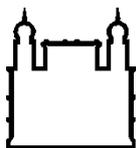
AVALIAÇÃO DO EFEITO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) NO RISCO DO CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Michelle de Oliveira e Silva

A associação do HPV ao câncer de orofaringe tem sido sugerida, apesar da variável prevalência viral nos diferentes estudos. Por outro lado, a relação etiológica do HPV em casos de câncer oral ou de hipofaringe/ laringe é ainda controversa. No entanto, estudos recentes tem sugerido que a presença do DNA do HPV nos tumores não é evidência suficiente para a associação causal, sendo fortemente indicado análises de expressão das oncoproteínas virais e do status do genoma do HPV. No presente estudo caso-controle, a prevalência do HPV foi analisada utilizando PCR-*nested* para detecção viral em 228 casos de câncer de cabeça e pescoço e 227 controles. A análise multivariada dos diferentes tipos de HPV e outros fatores de risco epidemiológicos, ambientais, clínicos e moleculares suportou a associação etiológica do HPV no câncer de orofaringe corroborando a hipótese de duas diferentes vias na carcinogênese, uma desencadeada por fatores ambientais, como o consumo de tabaco e álcool e outra direcionada pelo HPV, cujo efeito é evidenciado na ausência desses outros fatores de risco. Entretanto, os dados aqui apresentados sugerem uma relação limitada do HPV aos tumores da cavidade oral e hipofaringe/ laringe. Apesar da similaridade da prevalência do HPV em casos e controles, os dados deste estudo sugerem fortemente que a distribuição dos tipos de HPV quanto ao potencial carcinogênico é diferenciado, sendo HPV de baixo risco mais frequente em controles e de alto-risco nos casos de câncer de orofaringe. O estudo de casos para presença de DNA e transcritos de RNA de E6 e E7 do HPV por ISH em dois TMAs construídos para o presente estudo mostrou atividade transcricional apenas para os casos de câncer de orofaringe. A superexpressão de p16INK4a foi coincidente na identificação de atividade do HPV por IHQ em casos de câncer de orofaringe, mostrando a eficiência deste marcador. A presença de DNA do HPV integrado ao genoma foi detectada na maioria dos casos de câncer de orofaringe, diferente do encontrado para casos de câncer da cavidade oral ou hipofaringe/ laringe. Este cenário mostra claramente a distinta associação etiológica do HPV nos diferentes sítios anatômicos de câncer de cabeça e pescoço, principalmente nos paciente com câncer de orofaringe sem exposição aos principais fatores de risco, o tabaco e álcool.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

EFFECT EVALUATION OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS (HPV) ON THE RISK OF HEAD AND NECK CANCER

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Michelle de Oliveira e Silva

Human Papillomaviruses (HPV) have been associated with oropharynx cancer, even though previous studies show a wide variation of viral prevalence. On the other hand, the etiological relation of HPV on oral or hypopharynx/ larynx cancers is still controversial. However, recent studies have been suggesting that the presence of HPV DNA in tumors is not sufficient evidence for the causal association, for which analyses of viral oncoproteins expression and genome status are strongly indicated. In this case-control study, the prevalence of HPV was analyzed using nested-PCR for viral detection in 228 cases of head and neck cancer and 227 controls. Multivariate analyses of different types of HPV and other risk factors epidemiological, environmental, clinical and molecular supported the etiological association of HPV in oropharyngeal cancer, corroborating the hypothesis of two different pathways in carcinogenesis: One related to environmental factors such as tobacco and alcohol consumption, and the second linked to HPV, effect of which is evident in the absence of these other risk factors. However, the data presented here suggest a limited relationship of HPV in tumors of the oral cavity and hypopharynx/ larynx. Despite the similarity of HPV prevalence in cases and controls, data from this study strongly suggest that the distribution of HPV types regarding the carcinogenic potential is differentiated, with low-risk HPV been frequent in controls and high-risk ones in cancer cases of oropharynx. The cases study for the presence of DNA and RNA transcripts of E6 and E7 HPV by ISH in two TMAs constructed for the present study showed transcriptional activity only for cases of oropharyngeal cancer. The overexpression of p16INK4a was coincident in identifying HPV activity by IHC in cases of oropharyngeal cancer, showing the efficiency of this marker. The presence of HPV DNA integrated into the genome was detected in the majority of cases of oropharyngeal cancer, unlike observed for cancers of the oral cavity or hypopharynx/ larynx. This scenario clearly shows the distinct etiological association of HPV in different anatomical sites of cancer of the head and neck, especially in patients with oropharyngeal cancer without exposure to the main risk factors, tobacco and alcohol.

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Símbolo/ Sigla	Descrição
BNT	Banco Nacional de Tumores
CaSKi	Linhagem celular positiva para HPV16
CDKN2A	Gene inibidor de ciclina-dependente de quinase
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHL	Casos de câncer de hipofaringe/laringe
CID-10	Classificação Internacional de Doenças 10 ^a revisão
CO	Cavidade oral
CONEP/MS	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/ Ministério da Saúde
COro	Câncer de orofaringe
DAB	Diaminobenzidina
DIPAT	Divisão de Patologia do Instituto Nacional de Câncer
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphate</i>
DST	Doença Sexualmente Transmissível
EBER1	<i>EBV-encoded RNAs</i>
EBV	<i>Epstein-Barr Virus</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetracetic acid</i>
FFPE	<i>Formalin fixed paraffin embedded</i>
g	Gramas
GP05/06+	Iniciadores utilizados na segunda etapa das PCRs do presente estudo
HC2	Captura Híbrida versão 2
HE	Coloração por hematoxilina e eosina
HeLa	Linhagem celular positiva para HPV18
HIV	<i>Human Immune Deficiency Virus</i>
HPV	<i>Human Papillomavirus</i>
HSIL	<i>High grade squamous intraepithelial lesion</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalos de Confiança
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
INTO	Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia
ISH	<i>In-situ hybridization</i>
KCl	Cloreto de Potássio
KDa	Kilo Dalton
LCR	<i>Long Control Region</i>
LSIL	<i>Low grade squamous intraepithelial lesion</i>
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mm	Milímetro

mM	Milimolar
<i>Nested-PCR</i>	<i>Polimerase Chain Reaction</i> realizada em duas etapas
NIC	Neoplasia intra-epitelial cervical
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
p16INK4a	Proteína expressa pelo gene CDKN2A (sinônimos: ARF, CDK4I, CMM2, INK4, INK4a, MTS1, p14, p16, p19, p19Arf)
p53	Proteína traduzida a partir do gene TP53
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PDTIS	Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (Plataforma de Sequenciamento de DNA da FIOCRUZ)
PGMY	Iniciadores utilizados na primeira etapa das PCRs do presente estudo
PMN	<i>Polymorphonuclear cells</i>
pRb	Proteína traduzida a parti do gene retinoblastoma (RB1)
PSF	Programa de Saúde da Família
PV	<i>Papillomavirus</i>
Raji	Linhagem celular positiva para EBV
RB1	Gene retinoblastoma
RC	Razões de Chances
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SITEC	Seção Integrada de Tecnologia em Citopatologia do Instituto Nacional de Câncer
TAE	Tris Acetato EDTA
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNM	<i>Tumor, Node, Metastasis</i>
TP53	Gene TP53
TPC	Solvente não clorinado do conjunto de reagentes <i>Instrumedics</i>
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano ácido clorídrico
UICC	<i>International Union Against Cancer</i>
UKB	<i>Unfalkrankenhaus Berlin</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ng	Nanograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Classificação dos Papilomavírus	3
1.2. Biologia do HPV.....	5
1.3. O papel do HPV na etiologia do câncer de cabeça e pescoço	9
3. Objetivos.....	14
3.1. Objetivo geral	14
3.2. Objetivos específicos	14
4. Material e Métodos	15
4.1. Desenho do estudo	15
4.2. Seleção dos casos.....	15
4.3. Seleção dos controles.....	18
4.4. Coleta dos dados	18
4.5. Variáveis de estudo.....	19
4.6. Extração do DNA, detecção e tipagem do HPV	21
4.7. Análises histopatológicas e construção dos Tissue Microarrays	23
4.8. Análise da presença e determinação do estado físico do HPV por ISH	25
4.9. Análise da expressão de RNAm de E6 e E7 do HPV por ISH	26
4.10. Avaliação de p16INK4a.....	26
4.11. Análise da prevalência do Epstein-Barr Virus (EBV) por ISH	26
4.12. Diversidade de tipos de HPV em uma população de mulheres com e sem lesão cervical residentes no estado do Rio de Janeiro e comparação dos resultados encontrados com os	

tipos de HPV detectados no estudo caso-controle realizado a partir de amostras obtidas da região orofaríngea	27
4.13. Análises estatísticas	28
5. Resultados.....	29
5.1. Prevalência do HPV	29
5.2. Descrição da população do estudo segundo as características epidemiológicas e ambientais	36
5.2.1. Câncer de cabeça e pescoço	36
5.2.2. Câncer de orofaringe	49
5.3. Análises de hibridizações <i>in situ</i> e imuno-histoquímica.....	62
5.3.1. Controles	62
5.3.2. Casos de câncer da cavidade oral.....	66
5.3.3. Casos de câncer de orofaringe.....	75
5.3.4. Casos de câncer de hipofaringe/laringe.....	91
5.4. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade dos testes para detecção do HPV e superexpressão de p16INK4a	98
5.5. Hibridizações <i>in situ</i> para detecção do vírus Epstein-Barr	101
5.6. Análise das frequências e proporções dos tipos de HPV em mulheres com e sem lesão cervical e em casos de câncer e controles de orofaringe	102
6. Discussão	103
6.1. Prevalência e atividade do HPV no câncer de cabeça e pescoço.....	103
6.2. Fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço e de orofaringe	109
6.3. Superexpressão de p16INK4a como um marcador de atividade do HPV	114

7. Conclusões.....	116
8. Referências bibliográficas	118
9. Anexos.....	139
Anexo 1a. Cópia do documento de aprovação do projeto original 71/05 emitida pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.....	139
Anexo 1b. Cópia do documento de aprovação da emenda 1 do projeto 71/05 emitida pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.	140
Anexo 2. Cópia do documento de aprovação do estudo emitida pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia.....	141
Anexo 3. Versão do TCLE do projeto 71/05 para pacientes com material coletado previamente em cirurgia no INCA e armazenado pelo BNT.....	142
Anexo 4. Versão do TCLE do projeto 71/05 para pacientes a serem submetidos à biópsia de tumor de orofaringe.	146
Anexo 5. Questionário epidemiológico.	150
Anexo 6. Versão do TCLE aprovado pelo CEP do INTO para inclusão dos indivíduos do grupo-controle.....	158
Anexo 7. Construção dos <i>cell-blocks</i> a partir de linhagens celulares.....	161
Anexo 8. Imuno-histoquímica para p16INK4a.....	162
Anexo 9. Protocolo de hibridização <i>in situ</i> para detecção do EBV.	163
Anexo 10. Cópia do documento de aprovação do projeto original 19/05 emitida pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.....	166
Anexo 11. Artigo publicado durante o período de doutorado. Oliveira-Silva M, Lordello CX, Zardo LM, Bonvicino CR, Moreira MA 2011. Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. <i>Virol J.</i> 5;8:4.	167

Anexo 12. Distribuição dos estadiamentos dos casos de câncer de cabeça e pescoço e de orofaringe de acordo com a exposição ao HPV de alto ou baixo-risco.....	174
Anexo 13. Distribuição dos graus de diferenciação dos tumores de cabeça e pescoço e de orofaringe de acordo com a exposição ao HPV de alto ou baixo-risco.....	174
Anexo 14. Modelos preditores testados para o câncer de cabeça e pescoço.	175
Anexo 15. Modelos preditores testados para o câncer de orofaringe.	182
Anexo 16. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade dos testes de hibridização <i>in situ</i> para DNA e RNA do HPV e expressão de p16INK4a por imunohistoquímica baseados na técnica padrão-ouro para detecção do HPV por PCR nos casos de câncer de cabeça e pescoço.	189
Anexo 17. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade dos testes de hibridização <i>in situ</i> para DNA e RNA do HPV e expressão de p16INK4a por imunohistoquímica baseados na técnica padrão-ouro para detecção do HPV por PCR nos casos de câncer da cavidade oral.	189
Anexo 18. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade dos testes de hibridização <i>in situ</i> para DNA e RNA do HPV e expressão de p16INK4a por imunohistoquímica baseados na técnica padrão-ouro para detecção do HPV por PCR nos casos de câncer de orofaringe.	190
Anexo 19. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade dos testes de hibridização <i>in situ</i> para DNA e RNA do HPV e expressão de p16INK4a por imunohistoquímica baseados na técnica padrão-ouro para detecção do HPV por PCR nos casos de câncer de hipofaringe/ laringe.	190

1. Introdução

Os tumores de cabeça e pescoço, que incluem os sítios anatômicos classificados como cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe, cavidade nasal e seios paranasais e glândulas salivares (Deschler & Day 2008), estão entre os mais comuns na população mundial, com estimativas de aproximadamente 500.000 novos casos e 300.000 óbitos por ano no mundo (Bray et al. 2012; Ferlay et al. 2010). No Brasil, a estimativa de casos novos de câncer da cavidade oral e orofaringe para o ano de 2012 é de 9.990 homens e 4.180 mulheres (INCA 2012).

O desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço é um processo multifatorial, sendo pelo menos 75% dos casos atribuído ao consumo de tabaco e álcool (Blot et al. 1988; Herrero 2003; Negri et al. 1993). No entanto, 15% a 20% dos tumores não são relacionados à exposição por esses fatores (Gillison & Shah 2001; Jo et al. 2009), sendo os fatores de risco ainda pouco conhecidos para esses casos (Hashibe et al. 2007). A deficiência de micronutrientes, escassez de higiene oral e baixo status sócio-econômico foram relacionados a um maior risco para o câncer de cabeça e pescoço independentes do consumo de tabaco e álcool, embora outros estudos não tenham suportado esses achados (Conway et al. 2010; Elwood et al. 1984; Ferraroni et al. 1989; Garrote et al. 2001; Greenberg et al. 1991; Guha et al. 2007; Rezende et al. 2008; Sanchez et al. 2003; Talamini et al. 2000). Além desses fatores de risco sugeridos, outros estudos mostram evidências de associação etiológica de algumas infecções virais no carcinoma de cabeça e pescoço.

A infecção pelo Epstein Barr vírus (EBV) é associada ao linfoma de Burkitt e de Hodgkin, assim como ao carcinoma nasofaríngeo e gástrico (Young & Rickinson 2004). No entanto, poucos estudos acerca da presença do EBV nos distintos sítios de câncer de cabeça e pescoço não-nasofaríngeo foram realizados.

Ao longo dos últimos 20 anos, o Papilomavírus Humano (HPV, *Human Papillomavirus*), causa necessária para o câncer cervical (Walboomers et al. 1999), tem sido etiológicamente associado com um subgrupo de câncer de cabeça e pescoço (Franceschi et al. 1996; Gillison et al. 2000; Herrero et al. 2003; Kreimer et al. 2005; Schwartz et al. 1998; Smith et al. 2004). No entanto, a prevalência do HPV nos diferentes estudos com câncer de cabeça e pescoço varia de 0% a 100% (Campisi et al. 2007; Castro & Bussoloti Filho 2006; Chaudhary et al. 2009; Hansson et al. 2005; Hennessey et al. 2009; Herrero et al. 2003; Kreimer et al. 2005; Schwartz et al. 1998; Smith et al. 1998; Termine et al. 2008). No Brasil, a prevalência do HPV em casos de câncer oral varia de 0% a 90% (Acay et al. 2008; da Silva et al. 2007; Fregonesi et al. 2003; Kaminagakura et al. 2012; Lira et al. 2010; Mazon et al. 2011; Oliveira et al. 2009; Simonato et al. 2008; Soares et al. 2003; Soares et al. 2008; Soares et al. 2007), enquanto para casos de hipofaringe/laringe varia de 3,8% a 37,3% (Brito et al. 2000; de Oliveira et al. 2006; Hassumi-Fukasawa et al. 2012; Miranda et al. 2009; Silva et al. 2011). Até o momento, a associação do HPV em casos de câncer de orofaringe foi avaliada em somente um estudo caso-controle no Brasil (Ribeiro et al. 2011) que reportou uma baixa prevalência viral em ambos os grupos (4,4% nos casos e 0,2% nos controles). No entanto, nenhum desses estudos realizados no Brasil analisou a atividade do HPV nos tumores de cabeça e pescoço.

A variação na prevalência do HPV entre os diferentes estudos pode ter ocorrido devido à fatores como diferenças nas regiões geográficas dos pacientes analisados, tipos de amostras analisadas (fresco ou fixado), mas principalmente relacionada aos distintos métodos de detecção do HPV e a possíveis erros de classificação das áreas anatômicas analisadas (*e.g.* classificação de tumores de orofaringe como câncer oral).

A falta de detalhamento na identificação dos sítios dos tumores de cabeça e pescoço associados etiológicamente ao HPV dificulta a comparação dos estudos e generalização dos resultados (Braakhuis et al. 2009). Apesar disso, a maioria dos autores é concordante em mostrar que o principal subgrupo de tumores de cabeça e pescoço associado etiológicamente

ao HPV é o de orofaringe (Gillison et al. 2000; Klingenberg et al. 2010; Kreimer et al. 2005), ainda que a prevalência reportada tenha variado de 14% a 72% (D'Souza et al. 2007; Herrero et al. 2003).

Casos de câncer de cabeça e pescoço frequentemente apresentam mutações no gene supressor de tumor TP53 (Alsner et al. 2001; Brennan et al. 1995; Cabelguenne et al. 2001; Gillison et al. 2000; Ko et al. 2001; Temam et al. 2000), que são relacionadas ao nível de exposição ao tabaco e álcool (Ko et al. 2001). No entanto, uma associação inversa entre a presença de mutações no gene TP53 e a presença do HPV sugere a existência de duas vias paralelas ou sobrepostas no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço: uma desencadeada por fatores ambientais, como o consumo de tabaco e álcool e outra direcionada pelo HPV (Gillison et al. 2000).

Estudos caso-controle tem sido amplamente utilizados para a avaliação de fatores etiológicos no desenvolvimento de câncer. Esses estudos permitem estimar a força de uma associação hipotética, simultaneamente a outros fatores associados à carcinogênese com possibilidade de avaliação das circunstâncias sobre as quais a relação causa-efeito varia, isto é, da interação biológica entre os diferentes fatores (IARC 1980).

1.1. Classificação dos Papilomavírus

Segundo o ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), os Papilomavírus (PVs) pertencem à família Papillomaviridae, sendo a classificação baseada em análises filogenéticas das sequências de nucleotídeos da região L1 do genoma nos seguintes níveis taxonômicos: gêneros, espécies, tipos, subtipos e variantes.

Um novo isolado de PV é reconhecido a partir da clonagem do genoma completo e por mais de 10% de diferença nucleotídica na análise da região L1 em comparação a um tipo de PV previamente reconhecido e filogeneticamente mais próximo ao candidato a novo tipo.

Diferenças entre 2% a 10% na homologia dessas sequências definem um subtipo, enquanto diferenças menores que 2% definem variantes virais (de Villiers et al. 2004).

Os PVs são classificados em 16 gêneros e 43 espécies, sendo os HPVs distribuídos em cinco desses gêneros: *Alpha-papillomavirus*, *Beta-papillomavirus*, *Gamma-papillomavirus*, *Mu-papillomavirus* e *Nu-papillomavirus* (de Villiers et al. 2004) mostrados na figura 1.

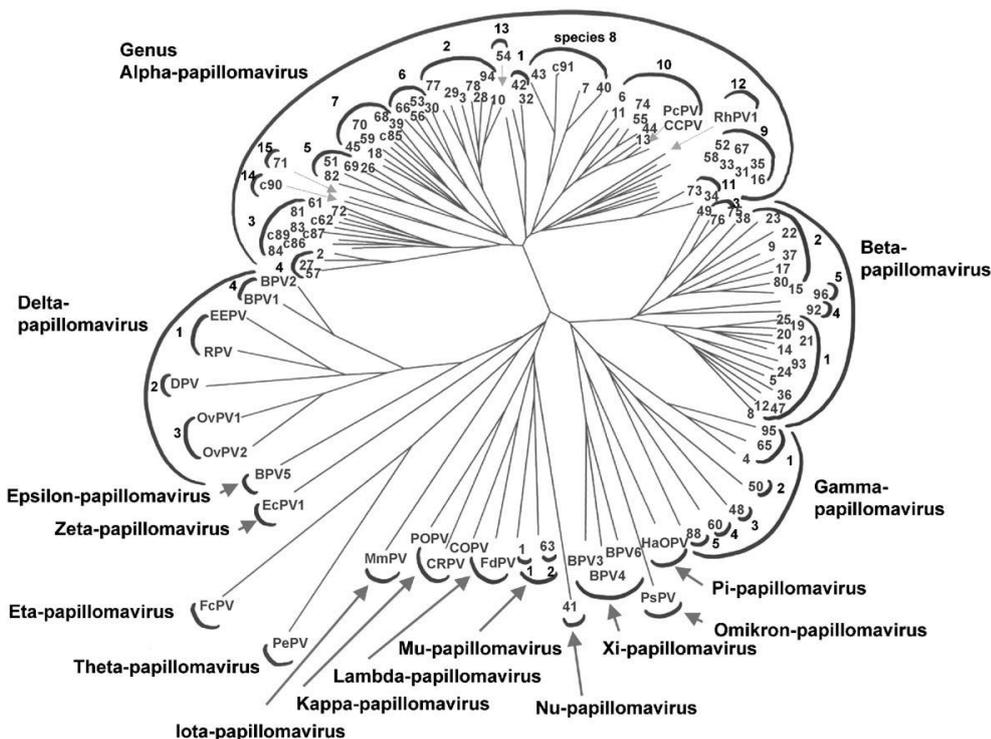


Figura 1. Árvore filogenética das sequências nucleotídicas da região L1 de 118 tipos de PVs. A extremidade de cada ramo mostra o respectivo tipo, enquanto os semicírculos mostram as espécies de PVs. A letra c seguida por números referem os candidatos a novos tipos de HPV. Fonte: (de Villiers et al. 2004).

Até o momento, mais de 100 tipos de HPV foram identificados e classificados epidemiologicamente baseado no potencial carcinogênico em tipos de baixo-risco (HPVs 6, 11, 40, 42, 43, 44, 55) e alto-risco (HPVs 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) (Munoz et al. 2003). De acordo com a última atualização de agentes carcinogênicos pela IARC, tipos adicionais de HPV, como 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 e 82 são classificados como prováveis alto-risco carcinogênico (IARC 2012). Os HPVs de baixo-risco são relacionados com o

desenvolvimento de lesões epiteliais escamosas de baixo-grau, enquanto os tipos de HPV de alto-risco são associados ao câncer cervical (Bosch et al. 2002; Walboomers et al. 1999).

1.2. Biologia do HPV

O HPV é um vírus pequeno, com 52 a 55 nm de diâmetro, não envelopado e epiteliotrófico. O genoma do HPV é composto por uma molécula de DNA fita dupla circular, com aproximadamente 8000 pares de bases (pb), oito regiões abertas de leitura (ORFs; *open reading frame*) contido no capsídeo composto pelas proteínas estruturais L1 e L2 (Crawford 1969; Favre et al. 1975) (Figura 2).

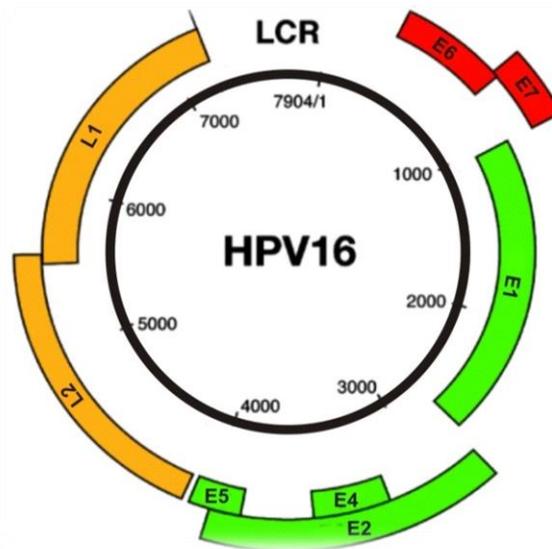


Figura 2. Representação gráfica do genoma do HPV16 com 7904pb mostrando as oito diferentes ORFs. Fonte: Modificado de www.clinsci.org/cs/110/0525/cs1100525f02.gif

As ORFs do HPV, localizadas na mesma fita de DNA, são divididas em três regiões: precoce (E; *early*), tardia (L; *late*) e regulatória (LCR; *long control region*) (Fehrmann & Laimins 2003). A região E codifica as proteínas regulatórias, incluindo aquelas envolvidas no processo de replicação viral e transformação celular, enquanto a região L codifica as proteínas estruturais do capsídeo (L1 e L2) expressas somente em células com infecção produtiva. As partículas de HPVs possuem um capsídeo com simetria icosaédrica composto em 80% por

proteínas L1 que juntamente as proteínas L2 estão organizadas em 72 capsômeros (Syrjänen & Syrjänen 1999).

A região regulatória LCR é a principal responsável por determinar o tropismo tecidual e de hospedeiros que cada tipo de HPV possui, além de atuar na regulação da expressão do genoma viral. A LCR é composta pela origem de replicação viral, quatro sítios de ligação para a proteína E2 e sítios de ligação para fatores de transcrição celular (Butz & Hoppe-Seyler 1993; Kurvinen et al. 2000).

As proteínas expressas pelos genes E estão principalmente envolvidas na replicação do DNA viral e na alteração das vias regulatórias da célula hospedeira (Sverdrup & Khan 1994). A proteína E1 possui atividade helicase, sendo bem conservada entre todos os tipos de HPV (Hughes & Romanos 1993). A proteína E2 é uma proteína de ligação ao DNA relacionada aos processos de replicação e transcrição viral (Androphy et al. 1987) e também relacionada à regulação da transcrição do HPV (Hawley-Nelson et al. 1988; Romanczuk & Howley 1992). A função da proteína E4, apesar de frequente nas fases tardias da infecção, é ainda pouco clara sendo associada com o colapso das redes de citoqueratina celular para facilitar a liberação viral (Doorbar et al. 1991). A proteína E5 está relacionada à indução da proliferação celular por ativação de fatores de crescimento e inibição de apoptose (Bouvard et al. 1994; Valle & Banks 1995).

As proteínas E6 e E7 possuem propriedades transformantes em HPVs de alto-risco, sendo relacionadas à replicação viral e ao desenvolvimento de tumor (Munger et al. 1989). A proteína E6 pode bloquear a atividade transcricional do gene TP53 da célula hospedeira, que codifica uma proteína supressora tumoral (Lechner et al. 1992; Mietz et al. 1992). E7 liga-se aos membros da família de proteínas supressoras tumorais retinoblastoma (pRb) e permite a progressão do ciclo celular, do G1 para a fase S (Dyson et al. 1989). E7 também induz a um número anormal de centrossomos e a instabilidade genômica (Duensing & Munger 2001,

2002). Os genes L1 e L2 codificam proteínas estruturais das partículas virais expressas nos estágios finais da replicação viral (Syrjänen & Syrjänen 1999).

Nos epitélios normais, as células-tronco estão ligadas à membrana basal e mantêm uma alta capacidade de auto-renovação. Após a divisão, as células filhas migram para as camadas mais superficiais do epitélio e sofrem o processo de diferenciação terminal. Após a saída da membrana basal, essas células interrompem o ciclo celular e começam a sintetizar queratina de alto peso molecular, que se acumula à medida que a célula atinge as camadas superiores do epitélio. Para a infecção, o HPV precisa romper o epitélio estratificado, o que pode ocorrer através de microlesões. Alguns estudos sugerem que proteoglicanos de sulfato de heparina desempenham um papel na entrada de vírus nas células (Giroglou et al. 2001), enquanto outros autores sugerem que a entrada do HPV ocorra através da endocitose por vesículas revestidas de clatrina (Day et al. 2003). Após a entrada do HPV, o genoma viral é mantido em um baixo número de cópias, exigindo para isso a expressão de E1 e E2. Estas proteínas se ligam à origem da replicação viral e recrutam DNA polimerases celulares e outras proteínas necessárias para a replicação (Conger et al. 1999).

A amplificação do genoma viral, expressão dos genes tardios e a produção dos vírions são induzidas em células suprabasais que retornaram para a fase S. O genoma viral mantém de 10 a 200 cópias episomais por célula nas camadas basais, ao longo da infecção. No entanto, esse número de cópias é bem maior nas células das camadas superiores do epitélio. Embora as células epiteliais normais saiam do ciclo celular após a diferenciação, as células infectadas pelo HPV são capazes de impedir os processos de checagem e assim, mantêm o ciclo celular ativo com a síntese das proteínas celulares necessárias para a replicação viral (Cheng et al. 1995; Hummel et al. 1992). Durante esta fase de amplificação, os genomas são empacotados em vírions infecciosos nos capsídeos antes da liberação pela ação das proteínas L1 e L2 (Buck et al. 2005). Após a transformação proteolítica dos componentes do vírion, os capsídeos passam

por um processo de maturação antes da liberação da célula, sendo então novos HPVs liberados para infecção de novos hospedeiros (Figura 3).

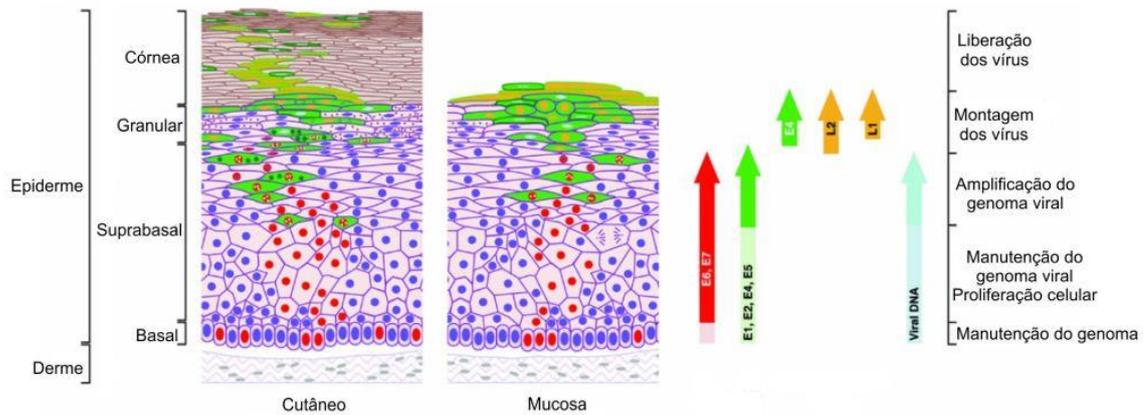


Figura 3. Ciclo de vida do HPV. As distintas camadas do epitélio estratificado escamoso são mostradas à esquerda. As células da epiderme expressando marcadores de ciclo celular são mostradas com núcleo vermelho. A expressão de proteínas virais E6 e E7, necessárias para replicação do genoma viral, ocorre acima da camada basal (células com citoplasmas verdes e núcleos vermelhos). Os genes L1 e L2 são expressos em um subgrupo de células contendo DNA viral amplificado nas camadas superiores do epitélio. As células com partículas infecciosas se desprendem da superfície epitelial (células com citoplasmas verdes e núcleos amarelos). A expressão de E6 e E7 na presença de baixos níveis de E1, E2, E4 e E5 permite a manutenção do número de cópias do genoma viral. A elevação nos níveis destas proteínas de replicação permite a amplificação do genoma viral e posterior montagem dos vírions com a expressão de L1 e L2. O acúmulo de E4 na superfície epitelial é relacionado a uma melhor eficiência na liberação dos vírus. Modificado de (Doorbar 2006).

1.3. O papel do HPV na etiologia do câncer de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço é frequentemente considerado um grupo homogêneo, apesar do reconhecimento de distintos fatores de risco associados aos diferentes sítios anatômicos, como a associação etiológica do HPV ao câncer de orofaringe e a controversa associação ao câncer oral ou de hipofaringe/laringe.

Um estudo de meta-análise recente mostrou um risco para o câncer oral 3,98 vezes maior para os indivíduos com infecção pelo HPV comparados àqueles sem infecção (Syrjanen et al. 2011). Porém, os autores dessa meta-análise não tiveram acesso à localização anatômica detalhada dos casos de câncer oral, o que pode ter levado a erros de classificação dos diferentes sítios de tumores. Além disso, dados de possíveis fatores de risco confundidores ao HPV não foram avaliados, como tabaco e álcool, reconhecidos como os principais fatores de risco para esta neoplasia (Blot et al. 1988; Garrote et al. 2001; Hashibe et al. 2007; IARC 2004). Outros estudos também sugeriram o HPV no câncer oral como um fator de risco independente, tendo sido reportado no México um risco 6,2 vezes maior para os casos HPV positivos (IC 95% = 2,98 - 12,97) em relação aos casos HPV negativos, mesmo ajustando pelo consumo de tabaco e álcool (Anaya-Saavedra et al. 2008). Esses achados são consistentes com outros estudos incluindo, portanto sítios de câncer de orofaringe aos tumores orais (Hansson et al. 2005; Smith et al. 1998). Por esta razão, alguns autores sugeriram que a presença do HPV em alguns tumores orais pode ser parcialmente explicada por erros de classificação de tumores de orofaringe como câncer oral (Herrero et al. 2003; Kreimer et al. 2005). Além disso, uma meta-análise realizada a partir de 17 estudos apontam ainda para uma fraca associação causal entre HPV16 e o câncer da cavidade oral (Hobbs et al. 2006).

De acordo com uma recente avaliação de carcinogenicidade do HPV realizada pela IARC, as evidências de associação causal entre o HPV16 e o câncer de hipofaringe/laringe são consideradas limitadas (Bouvard et al. 2009; Holzinger et al. 2009).

A razão para uma maior susceptibilidade da orofaringe, sobretudo as tonsilas, em relação ao HPV é ainda incerta, embora algumas hipóteses tenham sido sugeridas. Uma delas seria uma maior facilidade de infecção pelo HPV por invaginações da camada do epitélio nas criptas (Frisch & Biggar 1999) e a presença de citocinas produzidas por elementos do tecido linfóide que podem estimular a transcrição viral e transformação celular (Franceschi et al. 2000; Klingenberg et al. 2010).

Apesar da maior parte dos estudos sobre a associação etiológica do HPV no câncer de cabeça e pescoço serem baseados na prevalência de DNA viral no tecido tumoral, apenas a presença do HPV não pode ser considerada evidência suficiente para demonstrar a relação etiológica no câncer de cabeça e pescoço, uma vez que a expressão de RNAm de oncoproteínas virais e a integração do genoma viral são etapas necessárias para a carcinogênese (Holzinger et al. 2009; Rampias et al. 2009). Por outro lado, alguns autores sugerem que a ausência de DNA do HPV nos tumores não exclui a possibilidade da associação causal em estágio inicial, uma vez que algumas infecções por HPV podem ser transitórias dadas por um mecanismo denominado “*hit and run*” (Mork et al. 2001; Syrjanen 2003). No entanto, essa hipótese é improvável uma vez que a persistência das oncoproteínas E6 e E7 de HPVs de alto-risco parecem ser necessárias para a malignidade. Esse modelo carcinogênico foi demonstrado com base na expressão dessas proteínas no câncer cervical (Gillison 2006).

Ensaio de hibridação *in situ* (ISH) para detecção de DNA do HPV fornecem dados sobre as células infectadas, embora com sensibilidade limitada devido à diversidade de tipos de HPV, além das sondas utilizadas nessa técnica serem tipo-específica. A combinação das técnicas de ISH e PCR tem sido sugerida para detecção de HPVs com baixas cargas virais, localização e identificação das células infectadas e status do genoma viral, se episomal e/ou integrado (Miller et al. 1994).

Embora a integração do DNA do HPV no genoma celular seja uma forte indicação da função oncogênica do vírus, a presença de atividade transcricional de HPVs de alto-risco

também foi reportada na forma episomal do vírus em casos de câncer de orofaringe (Weinberger et al. 2006).

Em estudos mais recentes da relação do HPV no processo carcinogênico, a identificação da atividade transcricional viral tem sido cada vez mais valorizada (Hennessey et al. 2009; Hobbs et al. 2006). Alternativamente, a superexpressão do gene CDKN2A, identificada pela presença da proteína p16INK4a por imuno-histoquímica (IHQ), também tem sido sugerida como marcador para identificação de infecções ativas do HPV (Kong et al. 2007; Mulvany et al. 2008; Shi et al. 2009; Smith et al. 2008). A utilização deste marcador é sugerida como um método mais acessível em comparação a técnicas mais elaboradas, como PCR em tempo-real, visto a possibilidade de realização de IHQ utilizando material tumoral rotineiramente coletado, fixado e embebido em parafina (FFPE, *Formalin fixed paraffin embedded*). No entanto, poucos estudos realizaram comparações entre os testes para detecção do HPV por ISH e expressão de p16INK4a em casos de câncer de cabeça e pescoço por IHQ (Hoffmann et al. 2012; Singhi & Westra 2010; Smeets et al. 2007).

Diferenças moleculares e clínicas foram reportadas entre casos de câncer de orofaringe em indivíduos HPV positivos, os quais são menos associados ao consumo abusivo de álcool e tabaco, em comparação aos indivíduos HPV negativos (Gillison 2004; Gillison et al. 2000). Os casos associados ao HPV são relacionados à desregulação do ciclo celular induzido pelas oncoproteínas E6 e E7 de HPVs de alto-risco que levam à instabilidade genômica (D'Souza et al. 2007; Gillison & Lowy 2004), regulação negativa de p53, pRb e ciclina D1 e regulação positiva de inibidores de ciclinas dependentes de quinases como p16INK4a e p21 (Andl et al. 1998; Hafkamp et al. 2009; Klussmann et al. 2003; Li et al. 2004; Wiest et al. 2002; zur Hausen 2002). Por outro lado, os casos HPV negativos geralmente apresentam mutações no gene supressor de tumor TP53, frequente perda de heterozigosidade em regiões específicas como os loci cromossômicos 3p, 9p e 17p, níveis normais ou aumentados da pRb e níveis reduzidos de p16INK4a (Braakhuis et al. 2004; Vidal & Gillison 2008).

Em relação às diferenças clínicas, a associação etiológica entre o HPV16 e o câncer de orofaringe foi reportada por alguns estudos em pacientes mais jovens, com maior número de parceiros sexuais, prática de sexo oral e ausência de consumo excessivo de tabaco e álcool (Charfi et al. 2008; Licitra et al. 2006; Pintos et al. 2008; Weinberger et al. 2006). Apesar disso, alguns estudos apontam um melhor prognóstico para indivíduos HPV positivos em comparação àqueles indivíduos HPV negativos (Furniss et al. 2007; Gillison 2006; Gillison et al. 2000; Gillison & Lowy 2004; Hafkamp et al. 2004; Licitra et al. 2006; Ragin & Taioli 2007; Sturgis & Cinciripini 2007; Syrjanen 2005).

A hipótese de sinergismo entre o consumo de tabaco e álcool e a presença do HPV no câncer da cavidade oral ou de orofaringe, apesar de proposta por alguns autores, não foi confirmada por um recente estudo realizado nos EUA com 100 pacientes com câncer de orofaringe e 200 controles (D'Souza et al. 2007). Entretanto, em relação à distribuição dos tipos virais, apesar do limitado registro de dados (Termine et al. 2008), os estudos são concordantes em mostrar o HPV16 como o tipo prevalente nos casos de câncer da cavidade oral e orofaringe (D'Souza et al. 2007; Herrero et al. 2003; Kreimer et al. 2005; Syrjanen 2007).

Uma meta-análise realizada pela IARC incluindo 60 estudos de 26 países, totalizando 5046 casos de câncer de cabeça e pescoço, mostrou que a origem geográfica dos pacientes é um fator de variabilidade na prevalência do HPV, que é maior na América do Norte e Ásia que na Europa e países da América Central e do Sul, Austrália e África (Kreimer et al. 2005). Além disso, os autores sugerem ainda que diferentes fatores de risco possam estar relacionados ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço nas distintas regiões geográficas.

Tendo em conta a controversa variabilidade da prevalência do HPV, tanto em relação aos diferentes sítios de câncer de cabeça e pescoço quanto às distintas regiões geográficas analisadas, e o reduzido número de estudos analisando a relação etiológica do HPV nos tumores de cabeça e pescoço, sobretudo pela expressão das oncoproteínas virais, estudos adicionais são

necessários para determinar a contribuição do HPV e dos demais fatores clínicos, epidemiológicos e ambientais associados à carcinogênese de cabeça e pescoço.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Determinar a contribuição do HPV e de fatores clínicos, epidemiológicos e ambientais no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço através de um estudo caso-controle realizado com indivíduos atendidos em hospitais públicos de referência no município do Rio de Janeiro.

3.2. Objetivos específicos

- a. Estimar a prevalência da presença e tipos de HPV em casos e controles;
- b. Analisar a presença de DNA e o estado físico do genoma de HPVs de alto e baixo-risco nas células tumorais;
- c. Identificar a atividade do HPV pela expressão de RNAm das proteínas E6 e E7 nas células tumorais;
- d. Estimar a sensibilidade, especificidade e valores preditivos positivo e negativo do teste de p16INK4a como um marcador para identificação de infecções por HPV transcricionalmente ativas no câncer de cabeça e pescoço;
- e. Estimar a prevalência do Epstein-Barr vírus nas células tumorais;
- f. Comparar a diversidade de tipos de HPV detectados na região orofaríngea na amostra de casos e controles com a diversidade de tipos de HPV encontrada em uma população de mulheres com e sem lesões cervicais e residentes no estado do Rio de Janeiro;
- g. Analisar o efeito do HPV e a interação deste com demais fatores moleculares, epidemiológicos, ambientais e clínicos no risco de câncer de cabeça e pescoço.

4. Material e Métodos

O presente estudo caso-controle cumpre as exigências da resolução 196/96, sendo aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do INCA sob número de registro 71/05 (Anexo 1a e 1b) e do CEP do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO) sob número de registro 0002.1.305.000-09 (Anexo 2). Um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi obtido de todos os indivíduos incluídos no estudo. A utilização de qualquer material requerido para análise proveniente dos pacientes do INCA que eventualmente foram a óbito durante o período de realização desse estudo foi solicitada e consentida pelo CEP dessa instituição. Todos os questionários e TCLEs obtidos para a realização deste estudo estão arquivados em um armário de uso restrito e exclusivo aos profissionais envolvidos no estudo na Divisão de Genética do INCA.

4.1. Desenho do estudo

Trata-se de um estudo observacional descritivo do tipo caso-controle de base hospitalar, cujas amostras da população de casos e controles foram obtidas em dois hospitais públicos federais de referência localizados no município do Rio de Janeiro.

4.2. Seleção dos casos

Os 228 pacientes selecionados foram incluídos baseados nos seguintes critérios de elegibilidade: diagnóstico de carcinoma de cabeça e pescoço confirmado por resultados histopatológicos e não terem sido submetidos a tratamento até o momento do diagnóstico realizado na Divisão de Cabeça e Pescoço do Hospital do Câncer I do INCA. Os critérios de exclusão utilizados nesse estudo foram diagnóstico histopatológico de metástase e/ou tratamento quimioterápico ou radioterápico realizado anteriormente.

As amostras tumorais dos pacientes foram coletadas a partir de procedimentos cirúrgicos para excisão do tumor ou a partir de biópsias realizadas pelos médicos da Divisão de Cabeça e Pescoço do INCA. Os pacientes submetidos à cirurgia foram convidados e entrevistados pelo Serviço do Banco Nacional de Tumores (BNT) sobre a utilização do tecido coletado para atividades de pesquisa. Os pacientes que consentiram a doação do material assinaram um TCLE do BNT. A partir de uma seleção dos pacientes incluídos no BNT, um novo convite para participação para a realização do presente estudo foi feito para cada indivíduo selecionado, conforme as diretrizes e resoluções da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa/Ministério da Saúde (CONEP/MS). Um TCLE próprio desse projeto foi aplicado para cada paciente com material previamente coletado pelo BNT e que consentiu participar do presente estudo (Anexo 3).

O convite para participação dos pacientes candidatos aos procedimentos de biópsia foi realizado previamente à coleta do material tumoral pela enfermeira Maria Cristina Marques dos Santos do INCA. Os pacientes que consentiram participar do estudo assinaram um TCLE diferenciado (Anexo 4) e foram encaminhados para a realização de biópsia sob coordenação do Dr. Victor Perrusi do INCA.

Todos os pacientes incluídos no estudo foram entrevistados para a coleta de dados sócio-demográficos, dados relacionados à hábitos de vida e hábitos sexuais utilizando um questionário desenvolvido para este estudo (Anexo 5).

As amostras de tecido fresco foram coletadas e armazenadas pelo Serviço do Banco Nacional de Tumores (BNT) que mantiveram o material em solução de RNAlater® (Ambion) a -20°C por até 72 horas até serem submetidas à retirada dessa solução e imediatamente estocadas a -80°C. Um segundo fragmento de tecido tumoral de cada paciente foi encaminhado para a Divisão de Patologia (DIPAT) do INCA para inclusão em parafina e posterior análises histopatológicas.

De acordo com a localização anatômica do tumor, baseado na Classificação Internacional de Doenças 10ª revisão (CID-10), os pacientes selecionados para o estudo foram classificados em três subgrupos discriminados como: (1) Cavidade oral; (2) Orofaringe; (3) Hipofaringe/ laringe (Quadro 1).

Quadro 1. Localização anatômica dos casos de câncer de cabeça e pescoço segundo os códigos da Classificação Internacional de Doenças 10ª revisão (CID-10).

Localização anatômica	CID-10
Cavidade oral (83)	
Lábio, mucosa do lábio superior e inferior, língua, gengiva, assoalho da boca, palato duro, mucosa da bochecha.	C00.0, C00.3, C00.4, C02.0, C02.1, C02.2, C02.3, C03.0, C03.1, C04.0, C05.0, C06.0
Orofaringe (71)	
Base da língua, palato mole, úvula, tonsila, fossa tonsilar, pilar tonsilar, valécula, parede lateral, parede posterior.	C01.0, C05.1, C05.2, C09.9, C09.0, C09.1, C10.0, C10.2, C10.3
Hipofaringe/ Laringe (74)	
Hipofaringe, supraglote, glote, subglote, prega ariepiglótica.	C12.0, C13.0, C13.1, C32.1, C32.0, C32.2

4.3. Seleção dos controles

Os 227 indivíduos que constituíram o grupo-controle foram convidados a participar do estudo durante o período de abril a outubro de 2009 no INTO e possuíam como critério de elegibilidade a ausência prévia ou atual de diagnóstico de câncer. Os indivíduos que aceitaram o convite assinaram o TCLE (Anexo 6) e foram entrevistados para a coleta dos dados utilizando o mesmo questionário aplicado para os casos (Anexo 5).

A coleta das células superficiais da região orofaríngea dos controles foi realizada através de dois a quatro esfregaços com escova citológica estéril (*swab* bucal) de cada uma das seguintes áreas pré-definidas: base da língua (terço posterior), tonsilas palatinas direita e esquerda, e parede superior da orofaringe (superfície inferior do palato mole e úvula). As células coletadas foram armazenadas em 350 µL de solução RNAlater[®] (Ambion) em microtubo de polietileno e mantidas a 4°C até o procedimento de extração do DNA que ocorreu em no máximo 72 horas após a coleta.

4.4. Coleta dos dados

O desenvolvimento do questionário para coleta dos dados analisados no presente estudo (Anexo 5) foi realizado baseado no questionário padrão do BNT do INCA, que inclui questões sobre dados sócio-demográficos como local de residência, data de nascimento, situação conjugal, grau de instrução e cor da pele, além de questões relacionadas à hábitos de vida, como etilismo e tabagismo. Questões adicionais relacionadas à hábitos sexuais, como preferência sexual, idade do primeiro intercuro sexual, número de parceiros sexuais ao longo da vida, prática de sexo oral foram também incluídas baseado no questionário desenvolvido por D'Souza et al. (2007).

4.5. Variáveis de estudo

As variáveis analisadas nesse estudo foram agrupadas como: variáveis epidemiológicas, ambientais, clínicas ou moleculares. As variáveis epidemiológicas aqui analisadas foram: idade, sexo, situação conjugal, grau de instrução, cuidados bucal e cor da pele.

A variável epidemiológica situação conjugal foi categorizada como com companheiro (incluindo os indivíduos casados ou com relacionamento estável) ou sem companheiro (incluindo os indivíduos solteiros, separados, divorciados ou viúvos). A variável grau de instrução foi categorizada como ensino superior ou, ensino médio/ fundamental ou alfabetizado/ analfabeto. A variável cuidados bucal foi analisada pela realização ou não de consulta à odontologista nos últimos dois anos prévios à entrevista, a partir de dados acerca da higiene oral (≤ 1 vez/dia, 2 vezes/dia ou ≥ 3 vezes/dia) e a utilização ou não de enxaguante bucal.

A definição da cor da pele foi auto-referida, sendo definida como negra, parda e branca de acordo com os critérios do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE; http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2006/notas_brasil.pdf).

As variáveis ambientais aqui analisadas foram tabagismo, etilismo, preferência sexual, sexarca, número de parceiros sexuais, número de parceiros realizado sexo oral, uso de preservativo, exposição à Doença Sexualmente Transmissível (DST) e testagem para HIV.

A variável tabagismo foi classificadas de acordo com os critérios da IARC (1998). Os indivíduos foram categorizados como fumante, quando declarado o consumo de mais de 100 cigarros ao longo da vida; ex-fumante, quando o último cigarro consumido pelo indivíduo ocorreu em pelo menos um ano antes da entrevista; e nunca fumante, quando declarado o consumo de menos de 100 cigarros ao longo da vida. O tempo de tabagismo foi categorizado em ≤ 25 anos ou > 25 anos, baseado na distribuição média e mediana do grupo controle. A estimativa da carga tabágica foi realizada através do cálculo do número de ‘pacotes-ano’

consumidos, utilizando as informações da frequência de uso (número de cigarros consumidos por dia) e duração do uso. Esta variável foi categorizada em < 25 pacotes-ano e ≥ 25 pacotes-ano, usando como referência para ponto de corte a média de pacotes-ano consumidos pelos controles. A idade inicial de tabagismo foi categorizada em ≥ 16 anos ou < 16 anos, baseado nos valores da idade média dos controles.

A variável etilismo foi categorizada em nunca etilista, ex-etilista, quando o último padrão de bebida ocorreu em pelo menos um ano à entrevista; ou atual etilista. A estimativa do consumo de álcool (carga etílica) foi feita baseada no percentual de volume de álcool indicado no conteúdo de cada bebida, também denominada de sistema French ou Gay-Lussac. O cálculo do volume de etanol foi realizado de acordo com os critérios da IARC (1996), utilizando os seguintes fatores de conversão: 4,5% para cerveja, 12% para vinho e 40% para bebidas destiladas (*e.g.* para uma lata de cerveja foi calculado $350 \text{ mL} \times 0,045 = 15,75 \text{ mL}$ de etanol). A estimativa de consumo de álcool em gramas (g) foi realizada de acordo com os critérios da WHO (2000), que considera que 1 mL de etanol equivale à 0,79 gramas (g) de etanol. A classificação da carga etílica foi realizada baseada nos quartis das distribuições de consumo de etanol pelo grupo controle em ≤ 9 g/dia de etanol, 10 a 21 g/dia de etanol ou > 21 g/dia de etanol. Por exemplo, a equivalência desses valores em gramas de etanol para volume de cerveja são as seguintes: ≤ 9 g/dia de etanol = menos de uma lata de cerveja/ dia; 10 a 21 g/dia de etanol = uma ou duas latas de cerveja/ dia; > 21 g/dia de etanol = mais de 2 latas de cerveja/ dia.

Em relação à preferência sexual as categorias heterossexual ou homossexual/ bissexual foram utilizadas. A categorização das variáveis epidemiológicas relacionadas aos hábitos sexuais como número de parceiros e número de parceiros com a prática de sexo oral foi realizada com base na distribuição dos quartis do grupo controle, sendo utilizadas as categorias de ≤ 2 parceiros, 3-6 parceiros ou ≥ 7 parceiros. Baseado também na distribuição dos quartis do grupo controle, a variável sexarca foi categorizada em ≤ 15 anos ou > 15 anos. O uso de preservativo foi analisado pela frequência de utilização nas categorias geralmente ou sempre,

raramente ou nunca, enquanto a exposição à DST e testagem para HIV foi analisada como realizada ou não.

As variáveis clínicas analisadas foram topografia do tumor (cavidade bucal, orofaringe ou hipofaringe/ laringe), estadiamento do tumor de acordo com o sistema TNM (2008) e graduação histopatológica segundo os critérios de determinados pela UICC. As variáveis moleculares (em detalhes nos tópicos 4.6 e 4.8 a 4.11) foram classificadas pela presença/ausência de HPV, tipos de HPV detectados, presença/ausência de expressão de transcritos de RNAm das oncoproteínas virais E6 e E7, presença/ausência de superexpressão de p16INK4a e presença/ausência de EBV.

4.6. Extração do DNA, detecção e tipagem do HPV

O DNA total das amostras foi extraído utilizando o conjunto de reagentes *QIAamp DNA Mini Kit* (QIAGEN) conforme as especificações do fabricante, exceto para a etapa de eluição do DNA das amostras de *swab* bucal, a qual foi realizada com 30 µL de tampão AE contido no conjunto de reagentes. As amostras de DNA foram armazenadas à -20°C.

Para detecção do HPV, 100 a 250 ng de DNA foram submetido à PCR-*nested* para amplificação de fragmentos do gene *L1* do capsídeo do HPV. Nas primeiras etapas das PCRs foram utilizados 0,1 µM de iniciadores PGMY (Gravitt et al. 2000), 200 µM de cada dNTP, 1 mM de Mg⁺² e 1 U de *Taq Platinum* (Invitrogen). Nas segundas etapas das PCRs foram utilizados 2 µM dos iniciadores GP05/06+ (de Roda Husman et al. 1995), 200 µM de cada dNTP, 2 mM de Mg⁺² e 1 U de *Taq Platinum* (Invitrogen). O primeiro conjunto de iniciadores foi utilizado para amplificação de um fragmento de 450 pares de base (pb), sendo utilizado 5 µL do produto dessa reação para a realização da segunda etapa para amplificação de um fragmento de aproximadamente 140 pb. Em todos os testes para a detecção viral foram utilizados um controle positivo, constituído de 100 ng de DNA isolado da linhagem HeLa (HPV18+) e/ou CaSKi (HPV16+), e um controle negativo sem adição de DNA.

As PCRs foram realizadas sob as seguintes condições: 40 ciclos (desnaturação a 94°C por 2 minutos; anelamento a 55°C na 1ª etapa e 42°C na 2ª etapa por 30 segundos; extensão a 72°C por 40 segundos), precedidos por 2 minutos a 95°C e finalizados com 2 minutos de extensão, seguidos por resfriamento a 4°C. Essas reações foram realizadas em termocicladores *GeneAmp PCR System 2400* e *9600* (Applied Biosystems).

Os produtos amplificados foram submetidos à purificação utilizando o *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amershan Biosciences) para posterior sequenciamento dos fragmentos. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando 2,5 µL do *ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction V3.1* (Applied Biosystems), 3,2 pmoles do iniciador, 2 a 4 µL de DNA purificado e água mili-Q q.s.p. 10 µL. Essas reações consistiram de 25 ciclos (desnaturação a 96°C por 10 segundos; anelamento a 50°C por 5 segundos; extensão a 60°C por 4 minutos). Após a reação, as amostras foram armazenadas ao abrigo da luz a -20°C até a etapa da precipitação com isopropanol e posterior ressuspensão do material em formamida *HiDi* (Applied Biosystem). As sequências foram obtidas utilizando os sequenciadores *ABI 3730* ou *ABI 3130* (Applied Biosystem) da Plataforma de Sequenciamento de DNA/ PDTIS-FIOCRUZ ou do INCA, respectivamente.

A identificação dos tipos de HPV foi realizada primeiramente pelo programa BLASTn (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), sendo os tipos virais encontrados confirmados por análises filogenéticas através da edição e alinhamento das sequências obtidas com sequências de referência de HPV retiradas do GenBank. As análises das relações filogenéticas entre as cepas foi realizada com o programa MEGA 5.0, método *Neighbor-Joining* e Kimura 2-parâmetros como modelo de substituição nucleotídica (Tamura et al. 2011).

A classificação do potencial carcinogênico das cepas foi realizada de acordo com os dados disponibilizados pela IARC em <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php> (última atualização em 20 de junho de 2012).

4.7. Análises histopatológicas e construção dos Tissue Microarrays

O material tumoral dos pacientes incluídos no estudo foi analisado através de lâminas com secções de 3 µm coradas por hematoxilina e eosina (HE), segundo técnica padrão (Carson et al. 1996), para seleção dos blocos com melhor representatividade da neoplasia. Desta forma, cada paciente teve apenas um bloco de parafina utilizado em todas as etapas experimentais do estudo. Todos os casos foram revisados independentemente pelo Dr. Mário Henrique Magalhães Barros, do Instituto de Patologia *Unfalkrankenhaus Berlin* (UKB), Alemanha e pelo Dr. Roberto Alfonso Arcuri da Divisão de Patologia do INCA, e classificados de acordo com a *World Health Organization* (WHO 2005, disponível em <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/pat-gen/bb9/index.php>). Os pacientes foram estadiados de acordo com o sistema TNM (*Tumor, Node, Metastasis*) e os critérios determinados pela UICC

Dois TMAs foram construídos para a realização deste estudo, sendo o TMA1 com casos de câncer da cavidade oral e hipofaringe/ laringe e o TMA2 com casos de câncer de orofaringe. Adicionalmente, um caso com amostra de tecido de mucosa normal e controles positivos para HPV e EBV foram incluídos em ambos os TMAs. A inclusão dos controles positivos citados foi feita a partir da construção de *cell-blocks* desenvolvidos no laboratório (Anexo 7) com auxílio do Dr. Gustavo Stefanoff, utilizando as linhagens celulares de carcinoma cervical positivas para HPV, CaSki e HeLa, mantidas em cultura na Divisão de Genética do INCA. O *cell-block* feito a partir da linhagem celular proveniente de Linfoma de Burkitt, positiva para EBV, denominada Raji foi gentilmente cedido pelo Dr. Mário Henrique Magalhães Barros.

A construção dos TMAs foi realizada em colaboração com a Dra. Claudia Esther Alicia Rocio Hassan do Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO) do INCA, do Dr. Fernando Augusto Soares e do técnico Carlos Ferreira Nascimento, do Departamento de Patologia do Hospital A. C. Camargo, São Paulo.

A montagem dos TMAs foi realizada a partir da seleção de duas áreas diferentes e representativas do tumor de cada paciente identificadas pelo Dr. Mário Henrique Magalhães Barros em lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE). As regiões selecionadas foram identificadas nos respectivos blocos de parafina com material tumoral, dos quais foram excisados dois cilindros de 1 mm de diâmetro posteriormente transferidos para um bloco receptor de parafina utilizando o *Tissue Microarrayer Beecher SilverSpring* (Beecher Instruments). Para uma melhor aderência do material, uma lâmina de vidro foi colocada na superfície de inclusão dos tecidos, os quais foram mantidos a 37°C por 30 minutos e, posteriormente submetidos à gentil pressão sobre a lâmina para nivelamento de possíveis irregularidades durante a construção dos TMAs.

A partir dos blocos de TMAs foram feitas lâminas com espessura de 3 µm com e/ou sem o sistema de transferência por adesivo (Instrumedics). Na utilização desse sistema, o adesivo foi colocado na superfície do bloco de TMA submetido aos cortes, sendo estes transferidos para lâminas de vidro revestidas (Starfrost, Instrumedics) e mantidos por cinco minutos em luz ultravioleta. A remoção do adesivo foi feita após incubação por cinco minutos em solvente não clorinado (TPC, Instrumedics). As lâminas foram identificadas e então submetidas a um banho de parafina (Paraplast Merck) para posterior armazenamento a -20°C. Os blocos de TMA construídos foram mantidos à temperatura ambiente.

Todas as análises de ISH foram realizadas em lâminas sem adesivo e de IHQ em lâminas com adesivo, sendo todos esses ensaios realizados em colaboração com o Dr. Gerald Niedobitek, diretor do Instituto de Patologia *Unfal Krankenhaus Berlin* na Alemanha, durante o período de dezembro de 2011 a março de 2012.

4.8. Análise da presença e determinação do estado físico do HPV por ISH

Dois conjuntos de reagentes foram utilizados para detecção do HPV por ISH neste estudo. O primeiro conjunto, *INFORM HPV II Probes* (Ventana Medical Systems) incluiu sondas para hibridização de 11 tipos de HPVs de alto-risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58 e 66), enquanto o segundo conjunto de sondas foi utilizado para hibridização de dois tipos de HPVs de baixo-risco (6 e 11). Essa metodologia também permitiu a análise do status do genoma viral, se episomal, integrado ou com a presença de ambas as formas. Essas análises foram realizadas a partir de secções de 3 µm feitas a partir dos blocos de TMA de acordo com as instruções do fabricante utilizando o equipamento de auto-marcação Ventana Benchmark®.

Os casos mostrando sinais nucleares pontuais foram considerados como HPV com genoma integrado ao DNA tumoral, enquanto os casos mostrando *clusters* (sinais aglomerados) exclusivamente citoplasmáticos foram considerados como HPV com genoma episomal. De acordo com o fabricante, artefatos ou marcação não-específica foram considerados como: presença de precipitados na região não-celular de estroma, marcação no citoplasma de células polimorfonucleadas (PMN), eosinófilos, linfócitos, células endoteliais ou marcação de nucléolos.

4.9. Análise da expressão de RNAm de E6 e E7 do HPV por ISH

A detecção de transcritos de RNAm das proteínas virais E6 e E7 do HPV foi realizada utilizando o conjunto de reagentes RNAscope® 2.0 FFPE Assay Brown (DAB), para detecção de tipos de HPV de alto-risco (Wang et al. 2012). As reações foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, exceto pela utilização de estufa ao invés do sistema de hibridização HybEZ™.

Os casos foram considerados positivos para a expressão do RNAm de E6 e E7 com a presença de mais de um ponto de marcação por célula.

4.10. Avaliação de p16INK4a

A análise qualitativa de p16INK4a por imuno-histoquímica foi realizada utilizando o conjunto de reagentes CINtec® Histology, clone E6H4 (MTM Laboratories, Heidelberg, Germany) conforme detalhado no Anexo 8.

A superexpressão de p16INK4a foi considerada pela marcação citoplasmática e nuclear forte ou difusa de mais que 70% das células tumorais.

4.11. Análise da prevalência do Epstein-Barr Virus (EBV) por ISH

A infecção pelo EBV foi determinada por ISH utilizando sondas biotinizadas para RNAs transcritos a partir do gene EBER1, expresso no núcleo das células infectadas em latência seguindo o protocolo detalhado no Anexo 9.

4.12. Diversidade de tipos de HPV em uma população de mulheres com e sem lesão cervical residentes no estado do Rio de Janeiro e comparação dos resultados encontrados com os tipos de HPV detectados no estudo caso-controle realizado a partir de amostras obtidas da região orofaríngea

A diversidade e frequência dos diferentes tipos de HPV em amostras cervicais foram estimadas a partir da análise de 297 amostras cervicais coletadas previamente de mulheres residentes nos municípios de Duque de Caxias e Nova Iguaçu. Para a realização desse estudo, amostras de células cervicais em suspensão utilizadas em estudos prévios (Girianelli et al. 2009; Girianelli & Santos Thuler 2007; Girianelli et al. 2006) foram gentilmente cedidas pela Dra. Lucília Maria Gama Zardo da Seção Integrada de Tecnologia em Citopatologia (SITEC) do INCA em agosto de 2008. Esse estudo possui aprovação pelo CEP do INCA sob número 19/05 (Anexo 10). Os resultados desse estudo foram publicados em janeiro de 2011 (Anexo 11) e foram aqui utilizados para comparação da diversidade do HPV de casos e controles da região orofaríngea.

4.13. Análises estatísticas

A análise das variáveis categóricas foi realizada através de proporções e as diferenças entre as proporções avaliadas utilizando o teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. As variáveis contínuas foram analisadas usando medidas de tendência central e dispersão, enquanto as diferenças entre as médias foram estimadas usando a estatística de t-Student. Todos os testes estatísticos foram bicaudais e o grau de significância utilizado foi de 0,05.

Razões de Chances (RC) brutas e ajustadas e seus respectivos Intervalos de Confiança (IC) de 95% foram estimados por regressão logística multivariada. Modelos preditores para câncer de cabeça e pescoço e para câncer de orofaringe foram construídos pelo método direto considerando $p\text{-entrada} \leq 5\%$ e $p\text{-saída} \leq 10\%$ utilizando como critério de entrada a significância estatística e a importância biológica.

Os percentuais de concordância entre as diferentes metodologias para detecção do HPV foram estimados por estatística Kappa, a fim de ponderar o efeito da concordância pelo acaso. Todas as análises foram realizadas usando o *software* SPSS versão 19 para Windows (Chicago: SPSS Inc.).

A sensibilidade e especificidade dos testes de hibridização *in situ* para detecção de DNA e RNA do HPV e imuno-histoquímica para análise de superexpressão de p16INK4a foram calculadas separadamente, baseadas na metodologia padrão-ouro para detecção do HPV por PCR. A sensibilidade foi estimada pela proporção de indivíduos com resultado positivo para as metodologias de ISHs ou IHQ em relação ao número de indivíduos que tiveram resultado HPV positivo por PCR, enquanto a especificidade dos testes foi calculada pela proporção de indivíduos com resultados negativos por ISH ou IHQ que foram corretamente identificados por PCR.

5. Resultados

5.1. Prevalência do HPV

A prevalência do HPV nos pacientes com câncer de cabeça e pescoço foi de 11,0% (24/228), enquanto para os controles a prevalência foi de 22,9% (52/227).

A partir da análise dos indivíduos que tiveram os fragmentos do genoma viral amplificados, 76 sequências de HPV foram identificadas, sendo 23 destas provenientes de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e 53 dos indivíduos controles. Adicionalmente, cinco indivíduos do grupo-controle com resultado HPV positivo por PCR não tiveram as respectivas sequências determinadas devido à baixa qualidade dos eletroferogramas, os quais são sugestivos de co-infecção por diferentes tipos de HPV. Apesar da sequência do HPV de um indivíduo com câncer de orofaringe não ter apresentado qualidade suficiente para as análises filogenéticas, o resultado por BLASTn mostrou similaridade ao HPV16, sendo por isso considerada infecção por HPV de alto-risco para esse paciente nas análises estatísticas.

A análise filogenética realizada com todas as sequências de HPV obtidas nesse estudo (Figura 4) mostrou sete tipos diferentes do HPV associados aos casos de câncer de cabeça e pescoço (identificados em azul). Nesta análise, 52,2 % (12/23) das sequências foram identificadas como HPV 16; 17,4 % (4/23) como HPV 6; 13,0 % (3/23) como HPV 18; e 4,3 % (1/23) como cada um dos HPVs 35, 59, 73 e como um possível novo β -Papillomavirus cuja sequência referência depositada no Genbank (acesso 623465) é denominada de RTRX3 (Figura 4 e 5). Para o grupo-controle (identificados em verde), nove tipos de HPV diferentes foram observados, sendo 52,8 % (28/53) das sequências identificadas como HPV 6; 24,5 % (13/53) como HPV 16; 5,7 % (3/53) como HPV 70; 3,8 % (2/53) como cada um dos HPVs 18, 81 e 82; e 1,9 % (1/53) como cada um dos HPVs 31, 58 e 66 (Figura 4).

A presença de co-infecção por diferentes cepas de HPV foram identificadas para seis indivíduos do grupo-controle (CT 49, 66, 73, 74, 172 e 174). Os diferentes tipos de HPV foram

identificados a partir de diferentes produtos amplificados, sendo detectado para cinco destes indivíduos a presença de HPV de alto-risco com HPV 6 e um indivíduo (CT74) com a presença dos HPVs 18 e 70. As diferentes cepas de HPV desses indivíduos foram identificadas como 1 e 2 e mostradas entre parênteses na Figura 4.

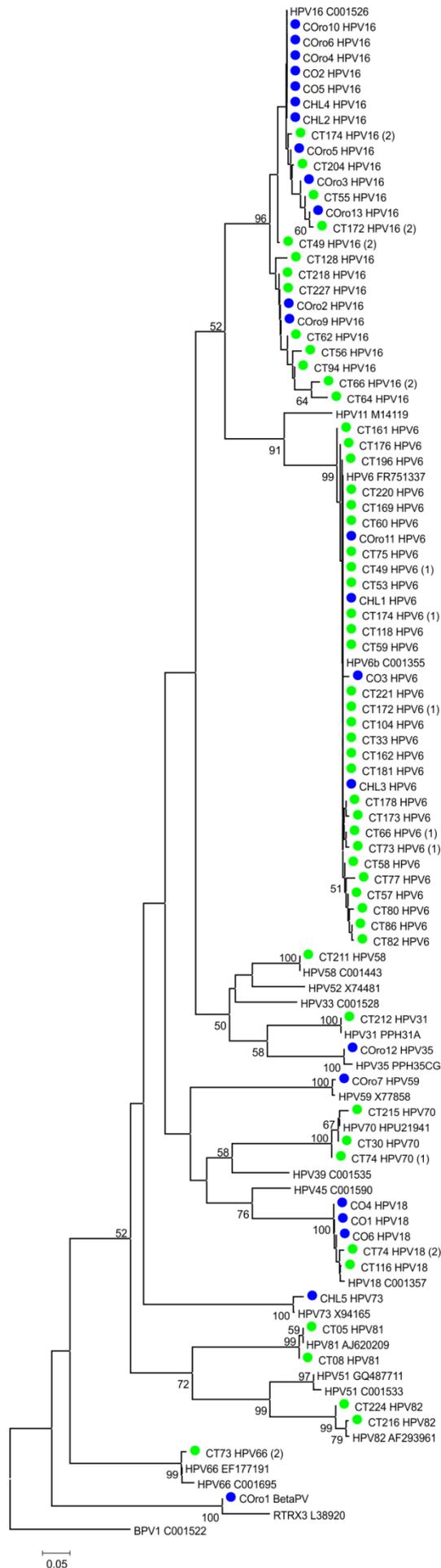


Figura 4. Análise filogenética de *NJ* para determinação dos tipos de HPV detectados nesse estudo, sendo (●) sequências do grupo-caso, (●) sequências do grupo-controle e as sequências retiradas do Genbank identificadas pelos respectivos números de acesso. Números próximos aos nós são valores de *bootstrap*.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
gi 6234651 L38920.1	Human papillomavirus unidentified type (RTRX3) L1 gene, partial cds	460	460	66%	4e-126	96%	
gi 29115651 Y15176.1	Human papillomavirus type 80 E6, E7, E1, E2, E4, L2, and L1 genes	283	283	78%	8e-73	82%	
gi 2394277 AF017184.1	Human papillomavirus major capsid protein L1 gene, partial cds	275	275	72%	2e-70	83%	
gi 396932 X74469.1	Human papillomavirus type 17 genomic DNA	271	271	79%	2e-69	81%	
gi 1020226 U31786.1	Human papillomavirus type 37, complete genome	271	271	83%	2e-69	81%	
gi 396924 X74468.1	Human papillomavirus type 15 genomic DNA	264	264	95%	5e-67	78%	
gi 186461194 EU410348.1	Human papillomavirus type 110, complete genome	260	260	76%	7e-66	81%	
gi 217883912 EU911341.1	Human papillomavirus isolate 06JAN_PHL_MY110_03 L1 capsid protein	254	254	73%	4e-64	81%	
gi 217883909 EU911340.1	Human papillomavirus isolate 06JAN_PHL_MY110_02 L1 capsid protein	248	248	73%	2e-62	81%	
gi 296495852 G0845444.1	Human papillomavirus type 122, complete genome	242	242	76%	1e-60	80%	
gi 896395 U21874.1	Human papillomavirus type 37 L1 protein gene, partial cds	239	239	69%	2e-59	81%	
gi 397068 X74464.1	Human papillomavirus type 9 genomic DNA	235	235	82%	2e-58	79%	
gi 6625721 AF193302.1	Human papillomavirus isolate uwSCC53.2 major capsid protein L1 (L1)	235	235	70%	2e-58	80%	
gi 6625719 AF193301.1	Human papillomavirus isolate uwSCC53.1 major capsid protein L1 (L1)	233	233	80%	9e-58	78%	
gi 238623465 FM955842.1	Human papillomavirus type 113, complete genome	229	229	84%	1e-56	78%	
gi 217882973 EU911036.1	Human papillomavirus isolate 06JAN_PHL_MY010_08 L1 capsid protein	229	229	72%	1e-56	80%	
gi 3183850 AJ001060.1	Human Papillomavirus L1 gene, clone qa9-4	229	229	67%	1e-56	81%	
gi 2791878 AF042006.1	Human papillomavirus isolate IA18 capsid protein (L1) gene, partial c	229	229	67%	1e-56	81%	
gi 343411593 HM959997.1	Human papillomavirus type 145 isolate CL4112, complete genome	225	225	96%	2e-55	76%	
gi 3885954 AF097699.1	Human papillomavirus isolate HPV17b L1 protein gene, partial cds	223	223	53%	7e-55	85%	
gi 186461202 EU410349.1	Human papillomavirus type 111, complete genome	221	221	80%	3e-54	79%	
gi 6234571 L38916.1	Human papillomavirus type 37 L1 gene, partial cds	219	219	58%	1e-53	83%	
gi 323695674 HM748617.1	Human papillomavirus isolate B21-CP major capsid protein L1 (L1) gei	217	217	70%	4e-53	79%	
gi 598358 L38388.1	Human papillomavirus L1 gene fragment	217	217	78%	4e-53	79%	
gi 2664390 Z95964.1	Human papillomavirus DNA for partial HPV L1 sequence, clone DL250	212	212	72%	2e-51	79%	
gi 39837143 AJ617549.1	Human papillomavirus proviral partial L1 gene for major capsid protein	212	212	78%	2e-51	78%	

Figura 5. Resultado obtido pelo BLASTn mostrando a similaridade de 96% entre a sequência COr01 obtida nesse estudo e a sequência RTRX3 de um β -Papillomavirus.

A relação de casos de câncer de cabeça e pescoço e controles com exposição ao HPV e tipos de HPV foi mostrada na tabela 2. Dentre os casos HPV+, 79,2 % (19/24) tiveram as cepas classificadas como possivelmente de alto-risco ou alto-risco, enquanto no grupo-controle essa prevalência foi de 46,8 % (22/47). A diferença entre as proporções de HPV de alto risco entre casos e controles foi estatisticamente significativa ($p = 0,011$). Para essa estimativa, os seis indivíduos do grupo-controle com co-infecção dupla por tipos de HPV de alto e baixo-risco ou dupla para alto-risco foram considerados para a presença de HPV de alto-risco.

Tabela 2. Distribuição das frequências de HPV nos casos de câncer cabeça e pescoço e nos controles.

	Casos de câncer de cabeça e pescoço (N = 228)		Controles (N =227)		p valor [§]
	No.	%	No.	%	
Exposição ao HPV					
Não	204	53,8	175	46,2	0,000*
Sim	24	31,6	52	68,4	
Tipo de HPV					
HPV6	4	14,8	23	85,2	
HPV16	13	50,0	13	50,0	
HPV18	3	60,0	2	40,0	
HPV66	0	0,0	1	100,0	
HPV31	0	0,0	1	100,0	
HPV35	1	100,0	0	0,0	
HPV58	0	0,0	1	100,0	
HPV59	1	100,0	0	0,0	
HPV70	0	0,0	2	100,0	
HPV73	1	100,0	0	0,0	
HPV81	0	0,0	2	100,0	
HPV82	0	0,0	2	100,0	
HPV-RTRX3	1	100,0	0	0,0	
Indeterminado	0	0,0	5	100,0	
Exposição por tipo de HPV					
Baixo-risco	5	16,7	25	83,3	0,011*
Alto-risco	19	46,3	22	53,7	

[§]Teste de Qui-quadrado.

A análise da prevalência do HPV estratificada por topografia do tumor mostrou uma maior prevalência de HPV para o câncer de orofaringe (18,3%; 13/71), seguido dos casos de câncer da cavidade oral (7,2%; 6/83) e casos de câncer de hipofaringe/laringe (6,8%; 5/74).

A tabela 3 mostra a distribuição das prevalências dos distintos tipos HPV identificados nos casos de câncer de orofaringe e nos controles. Dentre os casos de câncer de orofaringe HPV+, 84,6 % (11/13) apresentaram cepas classificadas como possivelmente de alto-risco ou alto-risco, enquanto no grupo-controle essa prevalência foi de 46,8 % (22/47). A diferença entre as proporções de HPV de alto risco entre casos de orofaringe e controles foi estatisticamente significativa ($p = 0,025$). Da mesma forma, para essa estimativa, os seis indivíduos do grupo-controle com co-infecção dupla por tipos de HPV de alto e baixo-risco ou dupla para alto-risco foram considerados para a presença de HPV de alto-risco.

A distribuição das frequências dos diferentes estadiamentos e graduações histopatológicas dos casos de câncer de cabeça e pescoço foram descritos segundo o sítio anatômico na Tabela 4. Uma maior proporção de HPV de alto-risco foi encontrada entre os casos com estadiamento avançado (graus III e IV), quando comparados aos casos com estadiamento precoce (graus I ou II) tanto para casos de câncer de cabeça e pescoço quanto para os casos de câncer de orofaringe, embora as diferenças entre as proporções não tenham sido estatisticamente significativas (Anexos 12 e 13).

Tabela 3. Distribuição das prevalências de HPV, mostradas por tipos virais, nos casos de câncer de orofaringe e nos controles.

	Casos de câncer de orofaringe (N = 71)		Controles (N =227)		p valor [§]
	No.	%	No.	%	
Exposição ao HPV					
Não	58	24,9	175	75,1	0,51
Sim	13	20,0	52	80,0	
Tipo de HPV					
HPV6	1	4,2	23	95,8	
HPV16	9	40,9	13	59,1	
HPV18	0	0	2	100	
HPV66	0	0	1	100	
HPV31	0	0	1	100	
HPV35	1	100	0	0	
HPV58	0	0	1	100	
HPV59	1	100	0	0	
HPV70	0	0	2	100	
HPV81	0	0	2	100	
HPV82	0	0	2	100	
HPV-RTRX3	1	100	0	0	
Indeterminado	0	0	5	100	
Exposição por tipo de HPV					
Baixo-risco	2	7,4	25	92,6	0,025*
Alto-risco	11	33,3	22	66,7	

[§]Teste de Qui-quadrado.

Tabela 4. Distribuição das frequências dos estadiamentos e graduações histopatológicas dos casos de câncer de cabeça e pescoço segundo o sítio anatômico.

	Cavidade oral (N=83)		Orofaringe (N=71)		Hipofaringe/Laringe (N=74)	
	N	%	N	%	N	%
Estadiamento						
I+II	31	48,4	18	28,1	15	23,4
III+IV	29	23,0	52	41,3	45	35,7
Grau do tumor						
1	32	47,1	21	30,9	15	22,1
2	45	34,4	33	25,2	53	40,5
3	5	19,2	15	57,7	6	23,1

5.2. Descrição da população do estudo segundo as características epidemiológicas e ambientais

5.2.1. Câncer de cabeça e pescoço

Na tabela 5 é possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre casos de câncer de cabeça e pescoço e controles em relação ao sexo dos indivíduos ($p = 0,000$). O mesmo foi observado entre as médias de idade dos casos (60,58 anos; $\pm 11,3$) e dos controles (52,52 anos; $\pm 11,9$).

De acordo com estas análises de proporções, as variáveis cor da pele, grau de instrução, higiene oral, consulta ao odontologista, exposição ao tabaco, tempo de tabagismo, consumo estimado em número de pacotes-ano, exposição ao álcool, tempo de etilismo, carga etílica, preferência sexual, número de parceiros sexuais, prática de sexo oral e número de parceiros com sexo oral e realização de teste para detecção do HIV foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 5. Distribuição das características epidemiológicas e ambientais entre os casos de câncer de cabeça e pescoço e controles.

	Casos de câncer de cabeça e pescoço (N = 228)		Controles (N = 227)		p valor
	No.	%	No.	%	
<u>Variáveis epidemiológicas</u>					
Sexo					
Feminino	44	27,7	115	72,3	0,000*
Masculino	184	62,2	112	37,8	
Cor da pele					
Negra	17	28,8	42	71,2	0,000*
Parda	90	43,9	115	56,1	
Branca	105	60	70	40	
Situação conjugal					
Com companheiro	127	45,4	153	56,6	0,069
Sem companheiro	88	54,3	74	45,7	
Grau de instrução					
Superior	13	27,7	34	72,3	0,000*
Ensino médio/ fundamental	172	47,9	187	52,1	
Alfabetizado/ analfabeto	30	83,3	6	16,7	
Higiene oral					
≥3 vezes/dia	39	22,4	135	77,6	0,001*
2 vezes/dia	39	35,5	71	64,5	
≤1 vez/dia	21	50	21	50	
Consulta ao odontologista					
Não	58	38,2	94	61,8	0,004*
Sim	40	23,6	132	76,7	
Uso de enxaguante bucal					
Não	55	27,5	145	72,5	0,245
Sim	41	33,6	81	66,4	

Continua ►

Continuação da Tabela 5▼

	Casos de câncer de cabeça e pescoço (N = 228)		Controles (N = 227)		p valor
	No.	%	No.	%	
Variáveis ambientais					
Exposição ao tabaco					
Nunca tabagista	28	13,0	126	55,8	0,000*
Ex ou atual tabagista	187	87,0	100	44,2	
Tempo de tabagismo					
≤25 anos	27	34,6	51	65,4	0,000*
>25 anos	160	76,6	49	23,4	
Nº de pacote-anos					
<25 pacotes/ano	44	44	56	56	0,000*
≥25 pacotes/ano	143	76,5	44	23,5	
Idade início do tabagismo					
≥16 anos	17	56,7	13	43,3	0,316
<16 anos	170	65,9	88	34,1	
Exposição ao álcool					
Nunca etilista	48	32,7	99	67,3	0,000*
Ex-etilista	137	67,2	67	32,8	
Atual etilista	43	41,3	61	58,7	
Tempo de etilismo					
≤11 anos	8	20	32	80	0,000*
12-21 anos	16	34	31	66	
>21 anos	140	69	60	31	
Carga etílica					
≤9 g/dia de etanol	9	22,5	31	77,5	0,000*
10-21 g/dia de etanol	9	29	22	71	
>21 g/dia de etanol	146	71,6	58	28,4	
Preferência sexual					
Heterossexual	86	27,7	224	72,3	0,000*
Homossexual ou bissexual	12	85,7	2	14,3	

Continua▶

Continuação da Tabela 5▼

	Casos de câncer de cabeça e pescoço (N = 228)		Controles (N =227)		p valor
	No.	%	No.	%	
Sexarca					
<15 anos	70	27,8	182	72,2	0,069
≥15 anos	27	39,1	42	60,9	
Nº de parceiros					
≤2 parceiros	13	17,8	60	82,2	0,029*
3-6 parceiros	26	28,9	64	71,1	
≥7 parceiros	59	37,1	100	62,9	
Prática de sexo oral					
Não	56	36,6	97	63,4	0,020*
Sim	42	24,7	128	75,3	
Nº de parceiros sexo oral					
≤2 parceiros	19	22,4	66	77,6	0,010*
3-6 parceiros	18	40	27	60	
≥7 parceiros	5	12,5	35	87,5	
Uso de preservativo					
Geralmente ou sempre	13	18,8	56	81,2	0,06
Raramente	30	35,3	55	64,7	
Nunca	54	32,3	113	67,7	
Exposição à DST					
Não	67	28,2	171	71,8	0,152
Sim	32	34,6	56	63,6	
Testagem para HIV					
Não	69	36,9	118	63,1	0,004*
Sim	30	21,9	107	78,1	
Exposição ao HPV					
Não	204	89,5	175	77,1	0,000*
Sim	24	10,5	52	22,9	
Exposição por tipo de HPV					
Baixo-risco	5	20,8	25	53,2	0,011*
Alto-risco	19	79,2	22	46,8	
Exposição por HPV16					
Negativo	215	94,3	214	94,3	1,000
Positivo	13	5,7	13	5,7	

A tabela 6 apresenta as estimativas de risco para câncer de cabeça e pescoço brutas e ajustadas por sexo, idade, tabaco e álcool, segundo as características epidemiológicas e ambientais. Nestas análises foi observado que indivíduos autorreferidos como pardos apresentaram um risco 6,55 vezes maior (IC 95% = 2,36 - 18,22) de câncer de cabeça e pescoço quando comparados aos indivíduos declarados negros, independente do sexo, idade e consumo de álcool e tabaco. Da mesma forma, os indivíduos que se consideraram brancos apresentaram um risco independente para o câncer de cabeça e pescoço 3,03 vezes maior (IC 95% = 1,17 - 7,85) que aqueles que se declararam negros.

Uma relação direta entre os indivíduos com menor grau de instrução e risco para câncer de cabeça e pescoço foi verificada independente do sexo, idade e consumo de álcool e tabaco. Desta forma, comparados aos indivíduos com elevado nível de instrução (nível superior), os indivíduos com escolaridade básica (até o ensino médio) apresentaram um risco 6,17 vezes maior (IC 95% = 2,18 - 17,41), enquanto os indivíduos alfabetizados ou analfabetos apresentaram um risco 11,57 vezes maior (IC 95% = 2,29 - 58,57) (Tabela 6).

Em relação ao consumo de tabaco, um maior risco para o câncer de cabeça e pescoço foi observado para os indivíduos que atualmente fumam ou já fumaram (RC 9,91; IC 95% = 1,05 - 4,87) em comparação aos que nunca fumaram independente do sexo, idade e consumo de álcool. Nas comparações de tempo de tabagismo e o número de pacotes-ano consumidos, um maior risco para o câncer de cabeça e pescoço também foi verificado para os indivíduos que fumaram por mais de 25 anos (RC 5,16; IC 95% = 2,43 - 10,96) em comparação aos que fumaram por um período menor, e para aqueles que consumiram mais de 25 pacotes-ano (RC 3,43; IC 95% = 1,73 - 6,80), independente da idade, sexo e do consumo de álcool (Tabela 6).

Nas análises de tempo de etilismo, um risco aumentado de 4,87 vezes para o câncer de cabeça e pescoço foi verificado para os indivíduos que consumiram álcool por mais de 21 anos (IC 95% = 1,90 - 12,48) quando comparados aos que consumiram por menos que 11 anos. Da mesma forma, um risco 5,71 vezes maior (IC 95% = 2,18 - 14,97) também foi verificado para

os indivíduos que consumiram mais de 21 gramas de etanol por dia em comparação àqueles que consumiram menos que 9 gramas de etanol por dia, independente da idade, sexo e do consumo de tabaco (Tabela 6).

Em relação aos hábitos sexuais, a orientação sexual homossexual ou bissexual, mostrou um risco 26,61 vezes maior (IC 95% = 1,55 - 456,92) para o câncer de cabeça e pescoço que os indivíduos heterossexuais. Um risco 3,49 vezes maior para o câncer de cabeça e pescoço também foi observado para os indivíduos com 3 a 6 parceiros sexuais em comparação àqueles com menos que 2 parceiros (IC 95% = 1,09 - 11,23), independente da idade, sexo e do consumo de álcool e tabaco (Tabela 6).

Nas análises brutas de associação, a exposição ao HPV de alto-risco mostrou um risco 4,32 vezes maior (IC 95% = 1,38 - 13,50) para o câncer de cabeça e pescoço, quando comparados à exposição por HPV de baixo-risco. No entanto, após o ajuste por consumo de álcool e tabaco, o risco perdeu a significância estatística embora tenha permanecido maior para os indivíduos positivos para HPV de alto risco (OR= 2,7; IC 95% = 0,50 - 14,59). Nenhuma associação foi verificada quanto à exposição ao HPV16 e o câncer de cabeça e pescoço (Tabela 6).

Tabela 6. Razões de chance brutas e ajustadas para o câncer de cabeça e pescoço, segundo as características epidemiológicas, ambientais e moleculares.

	Razões de Chances			
	Bruta	IC 95 %	Ajustada [§]	IC 95 %
<u>Variáveis epidemiológicas</u>				
Sexo				
Feminino	1,0		1,0	
Masculino	4,29	(2,82-6,53)*	2,26	(1,05-4,87)*
Cor da pele				
Negra	1,0		1,0	
Parda	3,71	(1,96-7,02)*	6,55	(2,36-18,22)*
Branca	1,93	(1,03-3,62)*	3,03	(1,17-7,85)*
Situação conjugal				
Com companheiro	1,0		1,0	
Sem companheiro	1,43	(0,97-2,11)	1,73	(0,86-3,50)
Grau de instrução				
Superior	1,0		1,0	
Ensino médio/ fundamental	2,41	(1,23-4,71)*	6,17	(2,18-17,41)*
Alfabetizado/ analfabeto	13,08	(4,42-38,69)*	11,57	(2,29-58,57)*
Higiene oral				
≥3 vezes/dia	1,0		1,0	
2 vezes/dia	1,90	(1,12-3,23)*	1,43	(0,55-3,71)
≤1 vez/dia	3,46	(1,72-6,98)*	1,29	(0,56-2,98)
Consulta ao odontologista				
Não	1,0		1,0	
Sim	0,49	(0,30-0,80)*	0,71	(0,34-1,48)
Uso de enxaguante bucal				
Não	1,0		1,0	
Sim	1,33	(0,82-2,17)	1,05	(0,49-2,24)

Continua ►

Continuação da Tabela 6 ▼

	Razões de Chances			
	Bruta	IC 95 %	Ajustada [§]	IC 95 %
<u>Variáveis ambientais</u>				
Exposição ao tabaco				
Nunca tabagista	1,0		1,0	
Ex ou atual tabagista	8,42	(5,23-13,55)*	9,91	(1,05-4,87)*
Tempo de tabagismo				
≤25 anos	1,0		1,0	
>25 anos	6,17	(3,5-10,86)*	5,16	(2,43-10,96)*
Nº de pacote-anos				
<25 pacotes/anos	1,0		1,0	
≥25 pacotes/anos	4,14	(2,46-6,96)*	3,43	(1,73-6,80)*
Idade início do tabagismo				
≥16 anos	1,0		1,0	
<16 anos	1,48	(0,69-3,18)	1,88	(0,69-5,12)
Exposição ao álcool				
Nunca etilista	1,0		1,0	
Ex-etilista	4,22	(2,68-6,63)*	0,95	(0,50-1,79)
Atual etilista	1,45	(0,86-2,45)	0,51	(0,25-1,04)
Tempo de etilismo				
≤11 anos	1,0		1,0	
12-21 anos	2,07	(0,77-5,51)	1,70	(0,57-5,06)
>21 anos	8,89	(3,85-20,38)*	4,87	(1,90-12,48)*
Carga etílica				
≤9 g/dia de etanol	1,0		1,0	
10-21 g/dia de etanol	1,41	(0,48-4,12)	1,65	(0,47-5,84)
>21 g/dia de etanol	8,67	(3,89-19,34)*	5,71	(2,18-14,97)*
Preferência sexual				
Heterossexual	1,0		1,0	
Homossexual ou bissexual	15,63	(3,43-71,27)*	26,61	(1,55-456,917)*

Continua ►

Continuação da Tabela 6 ▼

	Razões de Chances			
	Bruta	IC 95 %	Ajustada [§]	IC 95 %
Sexarca				
≥15 anos	1,0		1,0	
<15 anos	1,67	(0,96-2,92)	0,98	(0,44-2,16)
Nº de parceiros				
≤2 parceiros	1,0		1,0	
3-6 parceiros	1,87	(0,88-3,98)	0,61	(0,12-3,01)
≥7 parceiros	2,72	(1,38-5,38)*	0,52	(0,11-2,58)
Prática de sexo oral				
Não	1,0		1,0	
Sim	0,57	(0,35-0,92)*	0,56	(0,26-1,22)
Nº de parceiros sexo oral				
≤2 parceiros	1,0		1,0	
3-6 parceiros	2,32	(1,10-5,08)*	3,49	(1,09-11,23)*
≥7 parceiros	0,5	(0,17-1,44)	0,62	(0,15-2,53)
Uso de preservativo				
Geralmente ou sempre	1,0		1,0	
Raramente	2,06	(1,04-4,08)*	2,59	(0,90-7,44)
Nunca	2,35	(1,10-4,97)*	2,60	(0,82-8,22)
Exposição à DST				
Não	1,0		1,0	
Sim	1,46	(0,87-2,45)	0,92	(0,42-2,04)
Testagem para HIV				
Não	1,0		1,0	
Sim	0,48	(0,29-0,79)*	0,51	(0,24-1,11)
Exposição ao HPV				
Não	1,0		1,0	
Sim	0,4	(0,23-0,67)*	0,48	(0,21-1,09)
Exposição por tipo de HPV				
Baixo-risco	1,0		1,0	
Alto-risco	4,32	(1,38-13,50)*	2,70	(0,50-14,59)
Exposição por HPV16				
Negativo	1,0		1,0	
Positivo	1,0	(0,45-2,20)	0,56	(0,18-1,76)

[§]Razões de Chances ajustadas por sexo, idade, tabagismo (exposição ao tabaco) e etilismo (carga etílica).

A análise exploratória da interação do tabagismo e o etilismo no risco do câncer de cabeça e pescoço foi apresentada na tabela 7. De acordo com esta análise, foi observado um risco 5,87 vezes maior para os tabagistas atuais ou ex-tabagistas e consumidores de mais que 21 gramas de etanol por dia (IC 95% = 2,13 - 16,20) quando comparados aos indivíduos que nunca fumaram e consumiam menos de 9 gramas de etanol por dia.

Tabela 7. Análise exploratória da interação entre consumo de álcool e tabaco no risco de câncer de cabeça e pescoço.

	Razões de Chances (IC 95%)[§]	
	Nunca tabagista	Ex ou atual tabagista
Etilismo		
Nunca etilista	1,0	1,0
Ex ou atual etilista	0,40 (0,14-1,19)	1,03 (0,49-2,17)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	1,0
10-21 g/dia de etanol	1,41 (0,04-57,16)	1,59 (0,41-6,23)
>21 g/dia de etanol	6,49 (0,22-188,85)	5,87 (2,13-16,20)*

[§]Razões de Chances ajustadas por sexo e idade.

Dentre os indivíduos que nunca fumaram, o risco de câncer de cabeça e pescoço em indivíduos positivos para HPVs de alto-risco foi 5,84 vezes maior quando comparados aos indivíduos com HPV de baixo-risco, embora sem significância estatística (IC 95% = 0,43 - 78,84). Em adição, um risco 5,33 vezes maior para o câncer de cabeça e pescoço foi observado para os indivíduos positivos para HPV16 e que nunca fumaram em comparação aos indivíduos negativos ou com outros tipos de HPV, ainda que com valores limítrofes de significância estatística (Tabela 8).

Tabela 8. Avaliação do efeito do HPV no risco de câncer de cabeça e pescoço, segundo o status de consumo de álcool e tabaco.

	Razões de Chances (IC 95%)[§]			
	Nunca tabagista	Ex ou atual tabagista	Nunca etilista	Ex ou atual etilista
Resultado para HPV				
Negativo	1,0	1,0	1,0	1,0
Positivo	1,14 (0,4-3,24)	0,27 (0,13-0,58)	0,45 (0,14-1,45)	0,32 (0,16-0,63)
Exposição por tipo de HPV				
Baixo-risco	1,0	1,0	1,0	1,0
Alto-risco	5,84 (0,43-78,84)	2,86 (0,63-12,89)	2,94 (0,20-42,99)	3,19 (0,77-13,28)
Exposição por HPV16				
Negativo	1,0	1,0	1,0	1,0
Positivo	5,33 (0,94-30,19)	0,37 (0,14-1,01)	1,25 (0,17-9,34)	0,6 (0,22-1,59)

[§]Razões de Chances ajustadas por sexo e idade.

Entre os indivíduos nunca tabagistas e nunca etilistas, o risco de câncer de cabeça e pescoço para os indivíduos positivos para HPV de alto-risco foi 5,56 vezes maior do que para os indivíduos positivos para HPV de baixo risco, embora sem significância estatística (IC 95% = 0,48 - 64,68). Além disso, quando avaliado o risco de câncer de cabeça e pescoço entre os indivíduos positivos para HPV16 entre aqueles não expostos ao tabaco e ao álcool, foi observado uma razão de chance de 2,38 (IC 95% = 0,53 - 10,67), embora sem significância estatística (IC 95% = 0,53 - 10,67; Tabela 9).

Tabela 9. Associação entre o HPV e o câncer de cabeça e pescoço, segundo o efeito conjunto do consumo de álcool e tabaco.

	Razões de Chances (IC 95%)[§]			
	- Etilismo - Tabagismo	+ Etilismo - Tabagismo	- Etilismo + Tabagismo	+ Etilismo + Tabagismo
Resultado para HPV				
Negativo	1,0	1,0	1,0	1,0
Positivo	0,57 (0,22-1,43)	0,42 (0,23-0,77)	0,37 (0,19-0,70)	0,30 (0,16-0,58)
Exposição por tipo de HPV				
Baixo-risco	1,0	1,0	1,0	1,0
Alto-risco	5,56 (0,48-64,68)	2,97 (0,85-10,46)	2,60 (0,71-9,57)	3,35 (0,82-13,69)
Exposição por HPV16				
Negativo	1,0	1,0	1,0	1,0
Positivo	2,38 (0,53-10,67)	0,86 (0,34-2,16)	0,55 (0,22-1,42)	0,56 (0,22-1,43)

O sinal (-) significa nunca tabagista/ etilista, enquanto o sinal (+) significa ex- ou atual tabagista/ etilista. [§]Razões de Chances ajustadas por sexo e idade.

A tabela 10 mostra o modelo preditor do risco de câncer de cabeça e pescoço na amostra do presente estudo. De acordo com este modelo, os indivíduos tabagistas atuais ou ex-tabagistas apresentaram um risco 13,06 vezes maior de câncer de cabeça e pescoço, quando comparados aos indivíduos que nunca fumaram (IC 95% = 4,19 - 40,75), independente do sexo, idade, carga etílica, cor da pele e grau de instrução. Adicionalmente, uma relação direta da carga etílica com o risco de câncer de cabeça e pescoço foi observada nesse modelo, de modo que os indivíduos que consomem mais que 21 gramas de etanol por dia apresentaram um risco 8,16 vezes maior (IC 95% = 2,74 - 24,26) que àqueles que consomem até 9 gramas de etanol por dia, mesmo controlando o efeito de sexo, idade, tabagismo, cor da pele e grau de instrução. O modelo proposto mostra ainda que os indivíduos de cor da pele parda ou branca apresentam um risco aumentado de câncer de cabeça e pescoço comparado às pessoas de cor da pele negra (RCs 8,56 e 3,95, respectivamente), independente do sexo, idade, consumo de álcool e tabaco, e grau de instrução. Uma relação direta entre o risco de câncer de cabeça e pescoço e o grau de instrução foi também observada nesse modelo, de modo que comparados aos indivíduos com nível superior, os indivíduos com escolaridade básica (ensino fundamental ou médio) e indivíduos alfabetizados ou analfabetos mostraram um risco independente (RCs 7,37 e 19,03,

respectivamente). Os demais modelos testados com os dados desse estudo estão disponíveis no Anexo 14.

Tabela 10. Modelo preditor do risco de câncer de cabeça e pescoço na amostra de casos e controles hospitalares do Rio de Janeiro.

	Razões de Chances (IC 95%)[§]	
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	13,06	(4,19-40,75)*
Etilismo (carga etílica)		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	1,81	(0,46-7,14)
>21 g/dia de etanol	8,16	(2,74-24,26)*
Cor da pele		
Negra	1,0	
Parda	8,56	(2,94-24,91)
Branca	3,95	(1,46-10,65)*
Grau de instrução		
Superior	1,0	
Ensino médio/ fundamental	7,37	(2,50-21,72)*
Alfabetizado/ analfabeto	19,03	(3,37-107,58)*

[§]Razões de Chances ajustadas por sexo, idade e demais variáveis do modelo.

Log de Verossimilhança: 221,349; R²:0,56.

5.2.2. Câncer de orofaringe

Na tabela 11 é possível observar uma diferença estatisticamente significativa entre casos de câncer de orofaringe e controles em relação ao sexo dos indivíduos ($p = 0,000$). O mesmo foi observado entre as médias de idade dos casos (59,34 anos; $\pm 10,80$) e dos controles (52,52 anos; $\pm 11,9$).

De acordo com estas análises de proporções, as variáveis grau de instrução, higiene oral, consulta ao odontologista, exposição ao tabaco, tempo de tabagismo, consumo estimado em número de pacotes-ano, exposição ao álcool, tempo de etilismo, carga etílica, preferência sexual, número de parceiros sexuais, número de parceiros com sexo oral, realização de teste para detecção do HIV e exposição por tipo de HPV (alto ou baixo-risco) foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Tabela 11. Distribuição das características epidemiológicas e ambientais entre os casos de câncer de orofaringe e controles.

	Casos de câncer de orofaringe (N = 71)		Controles (N = 227)		p valor
	No.	%	No.	%	
<u>Variáveis epidemiológicas</u>					
Sexo					
Feminino	9	12,7	62	87,3	0,000*
Masculino	115	50,7	112	49,3	
Cor da pele					
Negra	5	7,4	42	18,5	0,08
Parda	41	60,3	115	50,7	
Branca	22	32,4	70	30,8	
Situação conjugal					
Com companheiro	42	60,9	153	67,4	0,315
Sem companheiro	27	39,1	74	32,6	
Grau de instrução					
Superior	3	4,3	34	15,0	0,000*
Ensino médio/ fundamental	54	77,1	187	82,4	
Alfabetizado/ analfabeto	13	18,6	6	2,6	
Higiene oral					
≥3 vezes/dia	18	28,6	135	59,5	0,000*
2 vezes/dia	26	41,3	71	31,3	
≤1 vez/dia	19	30,2	21	9,3	
Consulta ao odontologista					
Não	43	69,4	94	41,6	0,000*
Sim	19	30,6	132	58,4	
Uso de enxaguante bucal					
Não	41	66,1	145	64,2	0,881
Sim	21	33,9	81	35,8	

Continua ►

Continuação da Tabela 11 ▼

	Casos de câncer de orofaringe (N = 71)		Controles (N = 227)		p valor
	No.	%	No.	%	
<u>Variáveis ambientais</u>					
Exposição ao tabaco					
Nunca tabagista	6	8,7	126	55,8	0,000*
Ex ou atual tabagista	63	91,3	100	44,2	
Tempo de tabagismo					
≤25 anos	2	3,2	51	51,0	0,000*
>25 anos	61	96,8	49	49,0	
Nº de pacote-anos					
<25 pacotes/ano	5	7,9	56	56,0	0,000*
≥25 pacotes/ano	58	92,1	44	44,0	
Idade início do tabagismo					
≥16 anos	6	9,5	13	12,9	0,620
<16 anos	57	90,5	88	87,1	
Exposição ao álcool					
Nunca etilista	8	11,3	99	43,6	0,000*
Ex-etilista	36	50,7	67	29,5	
Atual etilista	27	38,0	61	26,9	
Tempo de etilismo					
≤11 anos	2	3,4	32	25,4	0,000*
12-21 anos	1	1,7	31	24,6	
>21 anos	55	94,8	63	50,0	
Carga etílica					
≤9 g/dia de etanol	1	1,7	31	27,9	0,000*
10-21 g/dia de etanol	4	6,9	22	19,8	
>21 g/dia de etanol	53	91,4	58	52,3	
Preferência sexual					
Heterossexual	56	88,9	224	99,1	0,000*
Homossexual ou bissexual	7	11,1	2	0,9	

Continua ►

Continuação da Tabela 11 ▼

	Casos de câncer de orofaringe (N = 71)		Controles (N =227)		<i>p</i> valor
	No.	%	No.	%	
Sexarca					
<15 anos	45	71,4	182	81,3	0,114
≥15 anos	18	28,6	42	18,8	
Nº de parceiros					
≤2 parceiros	7	11,1	60	26,8	0,021*
3-6 parceiros	18	28,6	64	28,6	
≥7 parceiros	38	60,3	100	44,6	
Prática de sexo oral					
Não	36	57,1	97	43,1	0,063
Sim	27	42,9	128	56,9	
Nº de parceiros sexo oral					
≤2 parceiros	11	40,7	66	51,6	0,034*
3-6 parceiros	12	44,4	27	21,1	
≥7 parceiros	4	14,8	35	27,3	
Uso de preservativo					
Geralmente ou sempre	11	17,5	56	25,0	0,255
Raramente	13	20,6	55	24,6	
Nunca	39	61,9	113	50,4	
Exposição à DST					
Não	44	69,8	171	75,3	0,417
Sim	19	30,2	56	24,7	
Testagem para HIV					
Não	48	76,2	118	52,4	0,001*
Sim	15	23,8	107	47,6	
Exposição ao HPV					
Não	58	81,7	175	77,1	0,511
Sim	13	18,3	52	22,9	
Exposição por tipo de HPV					
Baixo-risco	2	15,4	25	53,2	0,025*
Alto-risco	11	84,6	22	46,8	
Exposição por HPV16					
Negativo	62	87,3	214	94,3	0,067
Positivo	9	12,7	13	5,7	

Nas análises de associação das características epidemiológicas ajustadas por idade e sexo (Tabela 12), foi observado que os indivíduos autorreferidos como pardos apresentaram um risco 4,85 vezes maior (IC 95% = 1,36 - 17,38) para o câncer de orofaringe quando comparados aos indivíduos negros, independente da idade, sexo e do consumo de álcool e tabaco. Da mesma forma, os indivíduos que se autorreferiam como brancos apresentaram um risco para o câncer de orofaringe 5,84 vezes maior (IC 95% = 1,46 - 23,34) que aqueles declarados negros, independente da idade, sexo e do consumo de álcool e tabaco.

Uma relação direta entre os indivíduos com menor grau de instrução e risco para câncer de cabeça e pescoço foi verificada independente do sexo, idade e do consumo de álcool e tabaco. Desta forma, comparados aos indivíduos com elevado nível de instrução (nível superior), os indivíduos com escolaridade básica (até o ensino médio) apresentaram um risco 10,34 vezes maior (IC 95% = 1,98 - 53,95), enquanto os indivíduos alfabetizados ou analfabetos um risco 43,32 vezes maior (IC 95% = 4,77 - 393,59) (Tabela 12).

Um maior risco para câncer de orofaringe foi associado à falta de cuidados bucais, observada por um risco 2,78 vezes maior (IC 95% = 1,00 - 7,71) entre os indivíduos cuja escovação dentária foi inferior a uma vez ao dia, comparados aos indivíduos com escovação dentária maior que três vezes ao dia, independente do sexo, idade e do consumo de tabaco e álcool. Adicionalmente, os indivíduos que reportaram visita ao odontologista nos últimos dois anos prévios à entrevista foram ainda associados a uma redução do risco de câncer de orofaringe (RC 0,41; IC 95% = 0,18 - 0,95), independente do sexo, idade e do consumo de tabaco e álcool (Tabela 12).

Em relação ao consumo de tabaco, um risco 6,04 vezes aumentado para o câncer de orofaringe foi observado para os indivíduos que atualmente fumam ou já fumaram (IC 95% = 1,64 - 22,30) em comparação aos que nunca fumaram independente do consumo de álcool. Nas análises de tempo de tabagismo e o número de pacotes-ano consumidos, um maior risco para o câncer de orofaringe também foi verificado para os indivíduos que fumaram por mais de 25

anos (RC 53,57; IC 95% = 6,31 - 454,56) em comparação aos que fumaram por um período menor, e para aqueles que consumiram mais de 25 pacotes por ano (RC 17,96; IC 95% = 4,93 - 65,42), independente do consumo de álcool (Tabela 12).

Nas análises de tempo de etilismo, um risco aumentado de 9,54 vezes para o câncer de orofaringe foi verificado para os indivíduos que consumiram álcool por mais de 21 anos (IC 95% = 1,97 - 45,81) quando comparados aos que consumiram por menos que 11 anos. Da mesma forma, um risco 15,45 vezes maior (IC 95% = 1,94 - 122,85) também foi verificado para os indivíduos que consumiram mais de 21 gramas de etanol por dia em comparação àqueles que consumiram menos que 9 gramas de etanol por dia, independente do consumo de tabaco (Tabela 12). Por outro lado, a realização de teste para detecção do HIV foi negativamente associada ao câncer de orofaringe, visto a observação de uma redução do risco em 58% para esses indivíduos em relação aos que nunca haviam realizado o teste (IC 95% = 0,18 - 0,98).

Na análise bruta de associação quanto à exposição por HPV, um risco para o câncer de orofaringe aumentado em 6,25 vezes (IC 95% = 1,25 - 31,33) foi observado entre os indivíduos que apresentaram HPV de alto-risco em relação àqueles que apresentaram HPV de baixo-risco. Adicionalmente, um risco 2,39 vezes maior para o câncer de orofaringe, ainda que com valor limítrofe de significância, foi verificado para os indivíduos com exposição ao HPV16 (IC 95% = 0,98 - 5,86) em comparação aqueles com outros tipos ou negativos para HPV. No entanto, após o ajuste por consumo de álcool e tabaco, a significância estatística não foi observada para ambas as comparações (Tabela 12).

Tabela 12. Distribuição do risco do câncer de orofaringe, segundo as características epidemiológicas, ambientais e moleculares.

	Razões de Chances			
	Bruta	IC 95 %	Ajustada [§]	IC 95 %
<u>Variáveis epidemiológicas</u>				
Sexo				
Feminino	1,0		1,0	
Masculino	7,07	(3,36-14,91)*	2,34	(0,85-6,44)
Cor da pele				
Negra	1,0		1,0	
Parda	2,64	(0,93-7,50)	4,85	(1,36-17,38)*
Branca	3,00	(1,11-8,09)*	5,84	(1,46-23,34)*
Situação conjugal				
Com companheiro	1,0		1,0	
Sem companheiro	1,33	(0,76-2,32)	1,65	(0,69-3,98)
Grau de instrução				
Superior	1,0		1,0	
Ensino médio/ fundamental	3,28	(0,97-11,07)	10,34	(1,98-53,95)*
Alfabetizado/ analfabeto	24,56	(5,34-112,97)*	43,32	(4,77-393,59)*
Higiene oral				
≥3 vezes/dia	1,0		1,0	
2 vezes/dia	2,75	(1,41-5,35)*	1,79	(0,70-4,62)
≤1 vez/dia	6,79	(3,07-14,98)*	2,78	(1,00-7,71)*
Consulta ao odontologista				
Não	1,0		1,0	
Sim	0,32	(0,17-0,57)*	0,41	(0,18-0,95)*
Uso de enxaguante bucal				
Não	1,0		1,0	
Sim	0,92	(0,51-1,66)	1,37	(0,58-3,25)

Continua ►

Continuação da Tabela 12 ▼

	Razões de Chances			
	Bruta	IC 95 %	Ajustada [§]	IC 95 %
<u>Variáveis ambientais</u>				
Exposição ao tabaco				
Nunca tabagista	1,0		1,0	
Ex ou atual-tabagista	13,23	(5,50-31,82)*	6,04	(1,64-22,30)*
Tempo de tabagismo				
≤25 anos	1,0		1,0	
>25 anos	31,75	(7,36-136,97)*	53,57	(6,31-454,56)*
Nº de pacote-anos				
<25 pacotes/ano	1,0		1,0	
≥25 pacotes/ano	14,76	(5,46-39,94)*	17,96	(4,93-65,42)*
Idade início do tabagismo				
≥16 anos	1,0		1,0	
<16 anos	1,40	(0,50-3,90)	1,75	(0,5-6,16)
Exposição ao álcool				
Nunca etilista	1,0		1,0	
Ex-etilista	6,65	(2,91-15,20)*	1,71	(0,64-4,61)
Atual etilista	5,48	(2,34-12,83)*	1,93	(0,69-5,34)
Tempo de etilismo				
≤11 anos	1,0		1,0	
12-21 anos	0,52	(0,05-5,99)	0,42	(0,03-5,11)
>21 anos	13,97	(3,20-60-97)*	9,54	(1,97-45,81)*
Carga etílica				
≤9 g/dia de etanol	1,0		1,0	
10-21 g/dia de etanol	5,64	(0,59-53,93)	4,02	(0,37-43,87)
>21 g/dia de etanol	28,33	(3,74-214,80)*	15,45	(1,94-122,85)*
Preferência sexual				
Heterossexual	1,0		1,0	
Homossexual ou bissexual	14,00	(2,83-69,24)*	-	-

Continua ►

Continuação da Tabela 12 ▼

	Razões de Chances			
	Bruta	IC 95 %	Ajustada [§]	IC 95 %
Sexarca				
≥15 anos	1,0		1,0	
<15 anos	0,58	(0,30-1,20)	0,94	(0,4-2,20)
Nº de parceiros				
≤2 parceiros	1,0		1,0	
3-6 parceiros	2,41	(0,94-6,18)	0,60	(0,10-3,34)
≥7 parceiros	3,26	(1,37-7,75)*	0,52	(0,09-2,83)
Prática de sexo oral				
Não	1,0		1,0	
Sim	0,57	(0,32-1,00)	0,60	(0,26-1,38)
Nº de parceiros sexo oral				
≤2 parceiros	1,0		1,0	
3-6 parceiros	2,67	(1,05-6,78)*	2,83	(0,82-9,78)
≥7 parceiros	0,69	(0,20-2,31)	0,63	(0,14-2,84)
Uso de preservativo				
Geralmente ou sempre	1,0		1,0	
Raramente	1,2	(0,50-2,92)	1,55	(0,44-5,41)
Nunca	1,76	(0,83-3,69)	2,23	(0,75-6,66)
Exposição à DST				
Não	1,0		1,0	
Sim	1,32	(0,71-2,44)	0,82	(0,35-1,97)
Testagem para HIV				
Não	1,0		1,0	
Sim	0,35	(0,18-0,65)*	0,42	(0,18-0,98)*
Exposição ao HPV				
Não	1,0		1,0	
Sim	0,75	(0,38-1,48)	1,16	(0,42-3,22)
Exposição por tipo de HPV				
Baixo-risco	1,0		1,0	
Alto-risco	6,25	(1,25-31,33)*	3,92	(0,50-30,97)
Exposição por HPV16				
Negativo	1,0		1,0	
Positivo	2,39	(0,98-5,86)	1,65	(0,61-4,50)

[§]Razões de Chances ajustadas por sexo, idade, tabagismo (exposição ao tabaco) e etilismo (carga etílica).

A análise exploratória da interação do tabagismo e o etilismo no risco do câncer de orofaringe foi apresentada na tabela 13. De acordo com esta análise, foi observado um risco 13,82 vezes maior para os indivíduos atuais ou ex-fumantes e consumidores de mais que 21 gramas de etanol por dia (IC 95% = 1,71 - 111,43) em comparação aos indivíduos nunca tabagistas consumidores de menos que 9 gramas de etanol por dia.

Tabela 13. Análise exploratória da interação entre consumo de álcool e tabaco no risco de câncer de orofaringe.

	Razões de Chances (IC 95%) [§]	
	Nunca tabagista	Ex ou atual tabagista
Etilismo		
Nunca etilista	1,0	1,0
Ex ou atual etilista	2,13 (0,31-14,83)	1,68 (0,58-4,86)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	1,0
10-21 g/dia de etanol	-	2,55 (0,20-32,42)
>21 g/dia de etanol	-	13,82 (1,71-111,43)*

[§]Razões de Chances ajustadas por sexo e idade.

O risco de câncer de orofaringe dentre os indivíduos nunca tabagistas ou nunca etilistas mas positivos para HPVs de alto-risco não foi estimado devido à ausência de observações de infecção por HPV de baixo-risco nesses indivíduos (Tabela 14). Apesar disso, altas estimativas de risco para o câncer de orofaringe foram observadas tanto para indivíduos nunca tabagistas com exposição ao HPV16 (RC 88,88; IC 95% = 5,66 - 1397,86), quanto para indivíduos nunca tabagistas e nunca etilistas com exposição ao HPV16 (RC 15,24; IC 95% = 2,36 - 98,58), quando comparados aos indivíduos com infecção por outros tipos ou negativos para HPV (Tabela 14 e 15).

Tabela 14. Avaliação do efeito do HPV no risco de câncer de orofaringe, segundo o *status* de consumo de álcool e tabaco.

	Razões de Chances (IC 95%)[§]			
	Nunca tabagista	Ex ou atual tabagista	Nunca etilista	Ex ou atual etilista
Resultado para HPV				
Negativo	1,0	1,0	1,0	1,0
Positivo	5,11 (0,78-33,31)	0,54 (0,22-1,32)	0,84 (0,11-6,22)	0,64 (0,29-1,45)
Exposição por tipo de HPV				
Baixo-risco	1,0	1,0	1,0	1,0
Alto-risco	-	4,81 (0,67-34,34)	-	4,52 (0,76-26,9)
Exposição por HPV16				
Negativo	1,0	1,0	1,0	1,0
Positivo	88,88 (5,66-1397,9)*	0,67 (0,21-2,12)	7,89 (0,77-81,36)	1,13 (0,38-3,40)

[§]Razões de Chances ajustadas por sexo e idade.

Tabela 15. Análise do risco de HPV no câncer de orofaringe, segundo o efeito conjunto do consumo de álcool e tabaco.

	Razões de Chances (IC 95%)[§]			
	- Etilismo - Tabagismo	+ Etilismo - Tabagismo	- Etilismo + Tabagismo	+ Etilismo + Tabagismo
Resultado para HPV				
Negativo	1,0	1,0	1,0	1,0
Positivo	1,85 (0,47-7,35)	0,74 (0,34-1,59)	0,63 (0,27-1,48)	0,64 (0,30-1,41)
Exposição por tipo de HPV				
Baixo-risco	1,0	1,0	1,0	1,0
Alto-risco	-	4,62 (0,86-24,79)	3,90 (0,68-22,44)	5,34 (0,89-32,01)
Exposição por HPV16				
Negativo	1,0	1,0	1,0	1,0
Positivo	15,24 (2,36-98,58)*	1,79 (0,63-5,10)	1,13 (0,38-3,36)	1,11 (0,39-3,16)

O sinal (-) significa nunca tabagista/ etilista, enquanto o sinal (+) significa ex- ou atual tabagista/ etilista.

[§]Razões de Chances ajustadas por sexo e idade.

A tabela 16 mostra o modelo preditor do risco de câncer de orofaringe na amostra de casos e controles de orofaringe do presente estudo. De acordo com este modelo, foi observado que o risco para o câncer de orofaringe foi 7,48 vezes maior para os indivíduos ex ou atuais tabagistas (IC 95% = 1,97 - 28,36) em comparação àqueles nunca-tabagistas, independente do sexo, idade, tempo de etilismo e grau de instrução. Adicionalmente, uma relação direta entre o consumo de álcool e o câncer de orofaringe foi verificada por um risco aumentado em 4,12 vezes para os indivíduos com consumo de 10 a 21 gramas de etanol/dia (IC 95% = 0,37-45,99), e de 17,50 vezes para os indivíduos com consumo acima de 21 gramas de etanol/dia (IC 95% = 2,17-141,11) em comparação àqueles que consomem até 9 gramas de etanol/dia, independente do sexo, idade, tabagismo e grau de instrução. O modelo proposto mostra ainda que os indivíduos analfabetos ou somente alfabetizados mostraram um maior risco para o câncer de orofaringe (RC 12,18; IC 95% = 2,33 - 63,82), independentemente do sexo, idade, consumo de tabaco e álcool. Os demais modelos testados nesse estudo estão disponíveis no Anexo 15.

Tabela 16. Modelo preditor para o risco de câncer de orofaringe na amostra de casos e controles hospitalares do Rio de Janeiro.

	Razões de Chances (IC 95%)[§]	
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	7,48	(1,97-28,36)*
Etilismo (carga etílica)		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	4,12	(0,37-45,99)
>21 g/dia de etanol	17,50	(2,17-141,11)*
Grau de instrução		
Fundamental/ Médio/ Superior	1,0	
Analfabeto/ alfabetizado	12,18	(2,33-63,82)*

[§]Razões de Chances ajustadas por sexo, idade e demais variáveis do modelo.
Log de Verossimilhança: 143,435; R²: 0,48.

5.3. Análises de hibridizações *in situ* e imuno-histoquímica

5.3.1. Controles

Os controles positivos provenientes dos *cell-blocks* contruídos a partir das linhagens CaSki e HeLa e o controle negativo construído a partir da linhagem celular Raji, mostraram a integridade das células em coloração HE (Figuras 6A, B e C), respectivamente.

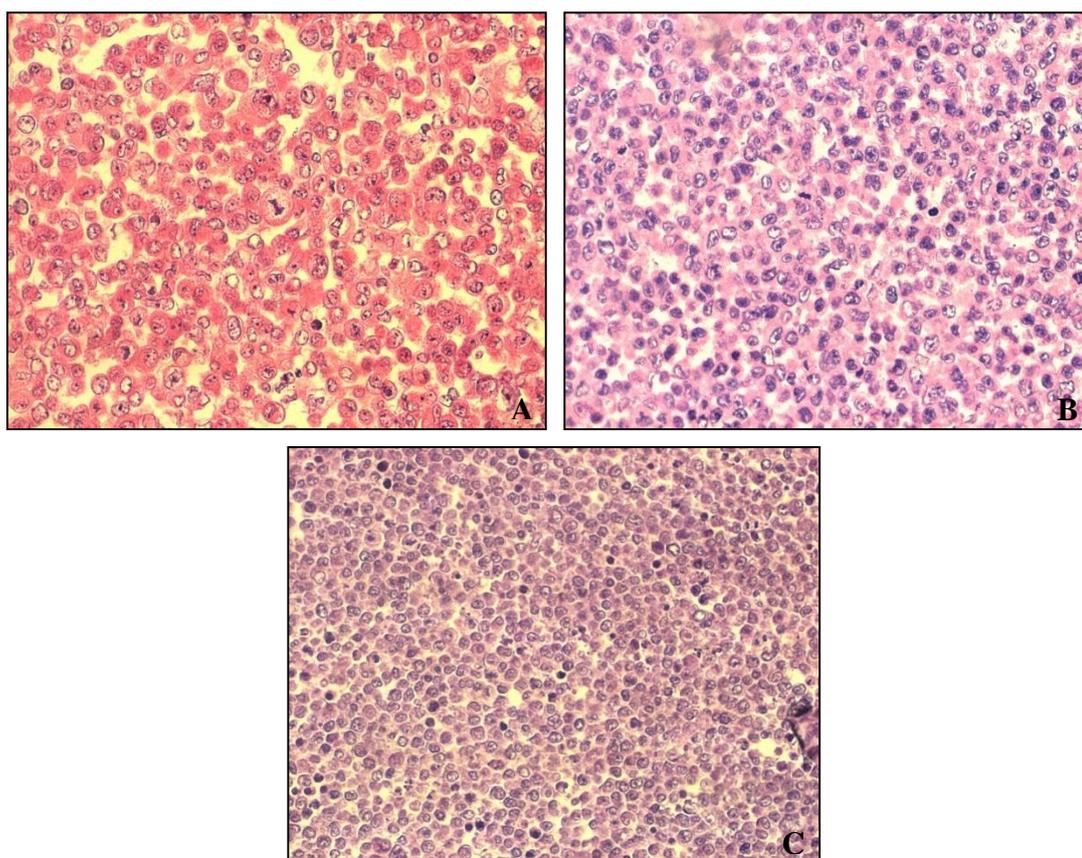


Figura 6. Lâminas com secções dos *cell-blocks* corados com HE. (A) células da linhagem CaSki, (B) células da linhagem HeLa e (C) células da linhagem Raji, ambas mostradas em aumento de 40X.

As linhagens HeLa e CaSki mostraram a presença do HPV integrado ao genoma observado pela identificação de pontos com coloração azul nos núcleos das células (Figura 7A). A linhagem Raji, utilizada como controle negativo para essa técnica, mostrou negatividade para HPV (Figura 7B).

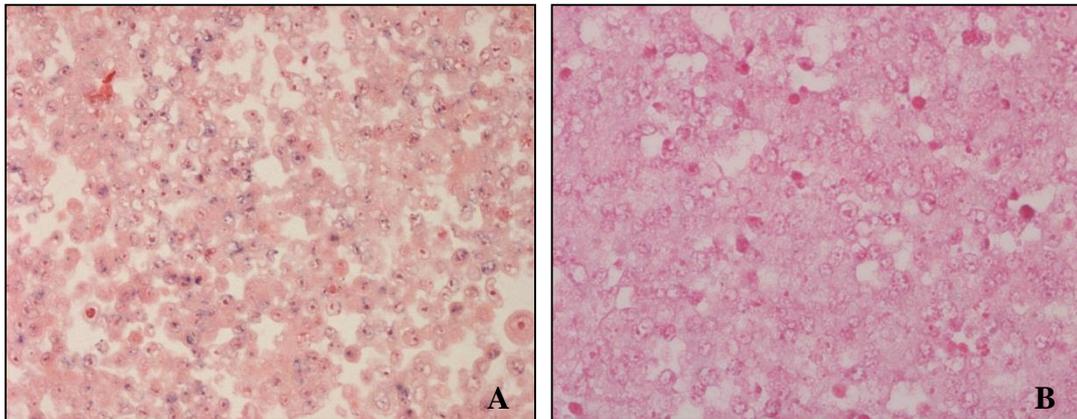


Figura 7. ISH para detecção de DNA de HPVs de alto-risco. (A) células da linhagem HeLa; (B) células da linhagem Raji, ambas mostradas em aumento de 60X.

A expressão dos transcritos virais E6 e E7 foi observada nos controles CaSki e HeLa através da presença de pontos de coloração castanha (Figuras 8A e 8B, respectivamente), e ausente para a linhagem Raji (Figura 8C).

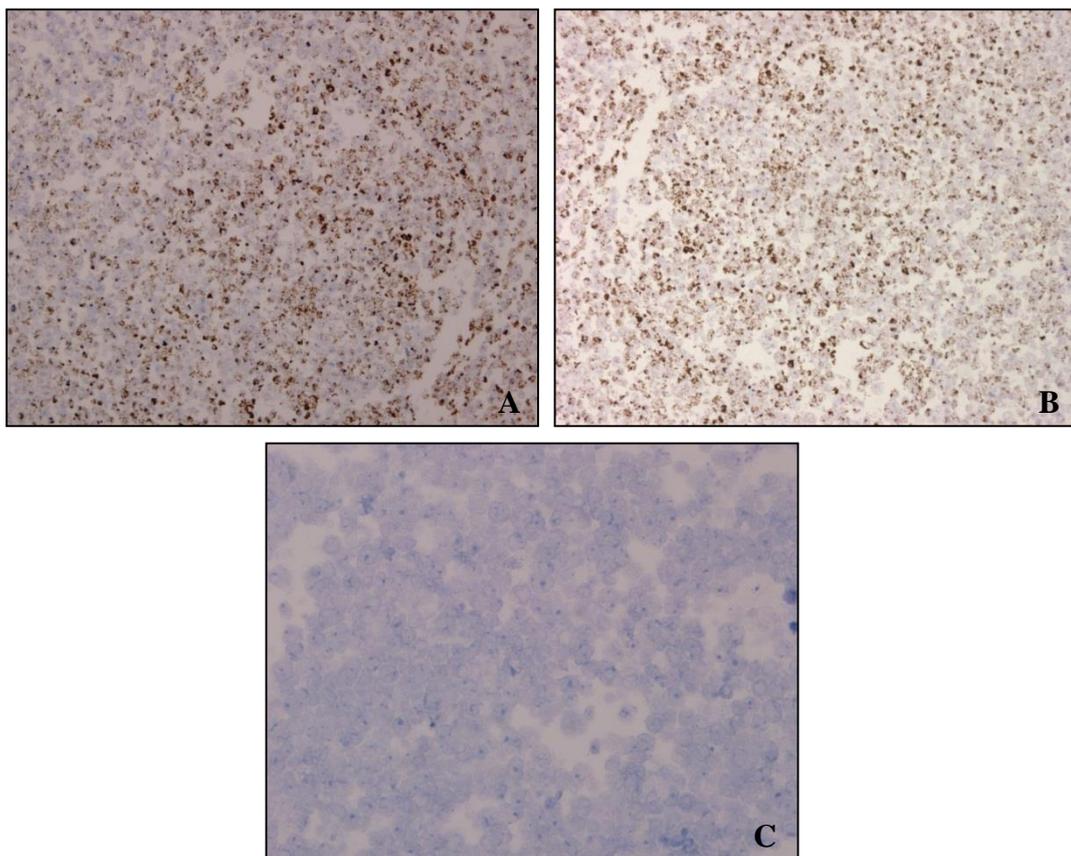


Figura 8. ISH para análise de RNA das proteínas E6 e E7 do HPV. (A) células da linhagem CaSki; (B) células da linhagem HeLa; (C) células da linhagem Raji, ambas mostradas em aumento de 40X.

A superexpressão de p16INK4a foi verificada para ambas as linhagens controles de HPV através da coloração nuclear e ou citoplasmática de cor castanha, não verificada para a linhagem Raji (Figura 9A, B e C).

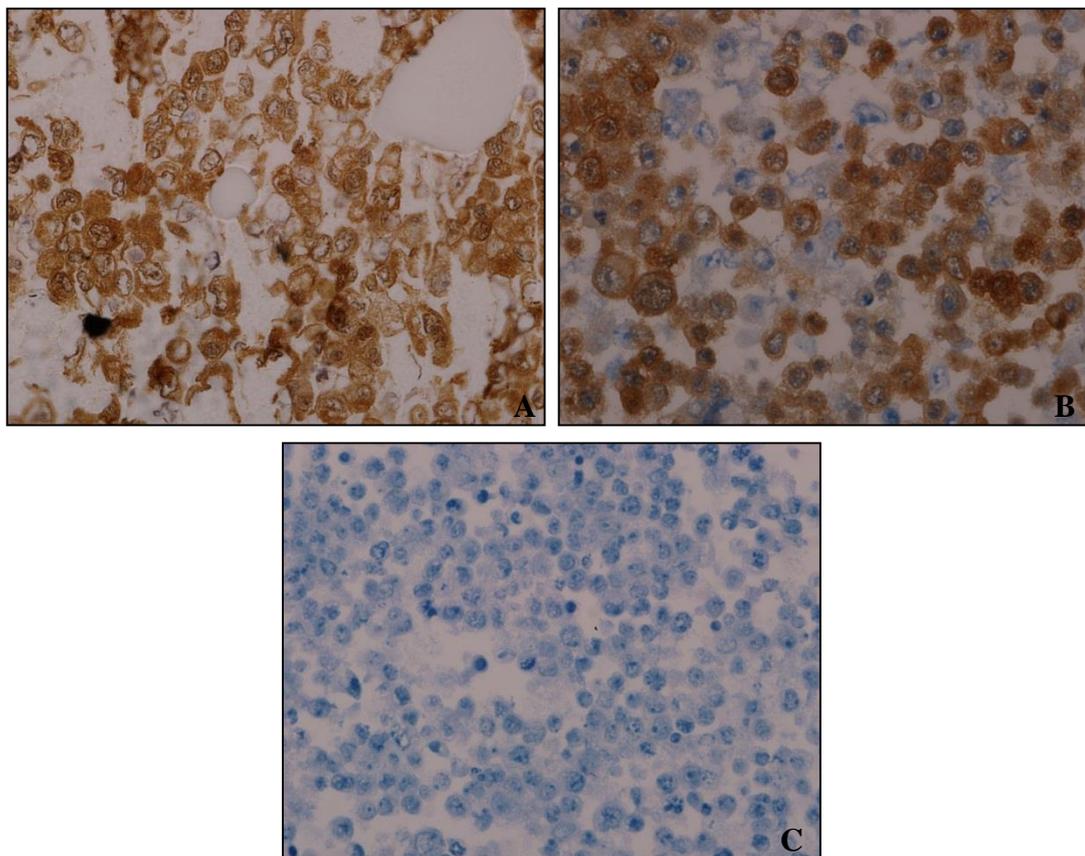


Figura 9. Imuno-histoquímica para análise de superexpressão de p16INK4a. (A) células da linhagem CaSki; (B) células da linhagem HeLa; (C) células da linhagem Raji, ambas mostradas em aumento de 60X.

5.3.2. Casos de câncer da cavidade oral

Os resultados das hibridizações *in situ* para DNA de alto e baixo-risco do HPV, RNA das proteínas virais E6 e E7 e imuno-histoquímica para p16INK4a dos seis casos de câncer da cavidade oral (CO) positivos por PCR foram mostrados na tabela 15. Destes casos (CO1 a CO6), três foram positivos por ISH para DNA de alto-risco do HPV, porém somente o caso CO1 (HPV18+) foi claramente positivo para HPV de alto-risco, mostrando o DNA de HPV integrado ao DNA das células tumorais (Figura 10A). Os dois demais casos positivos por ISH, CO2 (HPV16+) e CO3 (HPV6+), apresentaram discretos pontos de hibridização (Figura 11A e 12A). Os resultados das ISHs para HPV de alto-risco dos três casos positivos por PCR e negativos para ISH (CO4, CO5 e CO6) foram mostrados nas figuras 13A, 14A e 15A. Adicionalmente, os casos CO1 e CO3 foram os únicos que mostraram positividade por ISH para HPV de baixo-risco (Figuras 10D e 12D, respectivamente).

A presença de RNA das proteínas E6 e E7 do HPV não foi verificada para os casos de câncer da cavidade oral HPVs positivos por PCR (Figuras 11B, 12B, 13B, 14B, 15B).

A superexpressão de p16INK4a nos casos de câncer de cavidade oral foi verificada em cinco casos, dos quais somente um foi HPV+ por PCR e negativo para as hibridizações *in situ* para HPV (CO5; Figura 14C). Os quatro casos negativos para HPV e positivos para p16INK4a (CO7 a CO10) foram mostrados na figura 16. Os demais casos de CO analisados nesse estudo foram negativos para as hibridizações *in situ* para DNA de alto e baixo-risco do HPV, RNA das proteínas virais E6 e E7 e imuno-histoquímica para p16INK4a.

Tabela 17. Tipos de HPV encontrados por sequenciamento, detecção de DNA de HPV e de RNA das proteínas virais E6/E7 por hibridização *in situ* e imuno-histoquímica para p16INK4a para os casos de câncer da cavidade oral positivos por PCR.

Casos de câncer da cavidade oral	Tipo de HPV	ISH alto-risco	ISH baixo-risco	ISH E6E7	IHQ p16INK4a
CO1	HPV18	+	+	-	-
CO2	HPV16	+	-	-	-
CO3	HPV6	-	+	-	-
CO4	HPV18	-	-	-	-
CO5	HPV16	-	-	-	+
CO6	HPV18	-	-	-	-

- **Caso CO1 (HPV18)**

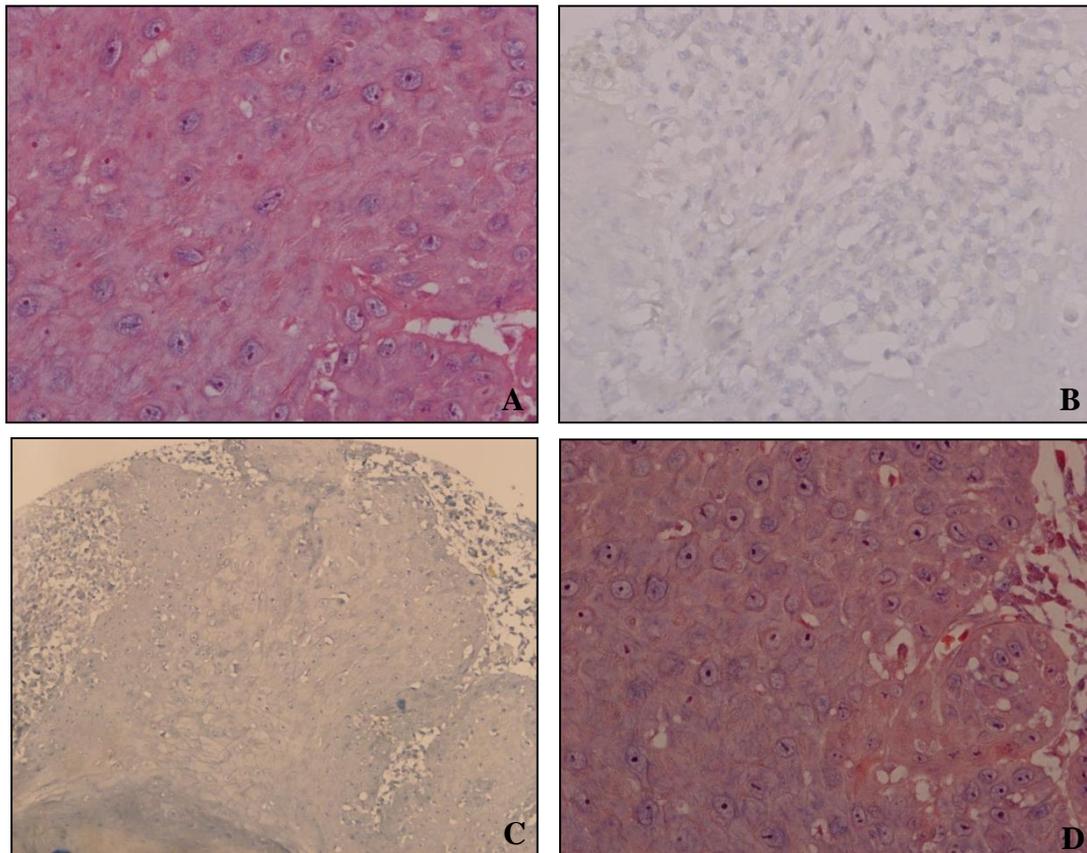


Figura 10. Caso de câncer da cavidade oral CO1. (A) ISH para HPVs de alto-risco; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7, ambas mostradas em aumento de 60X; (C) IHQ para p16INK4a mostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso CO2 (HPV16)**

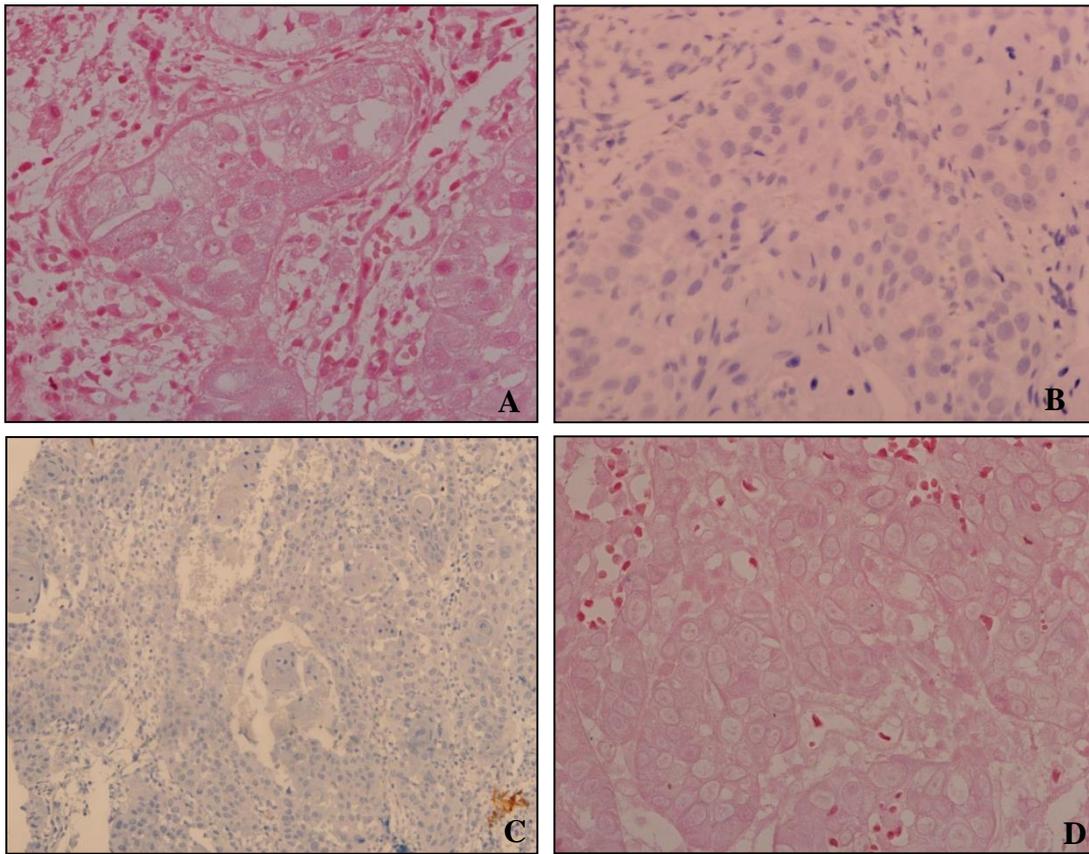


Figura 11. Caso de câncer da cavidade oral CO2. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 60X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4a mostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso CO3 (HPV6)**

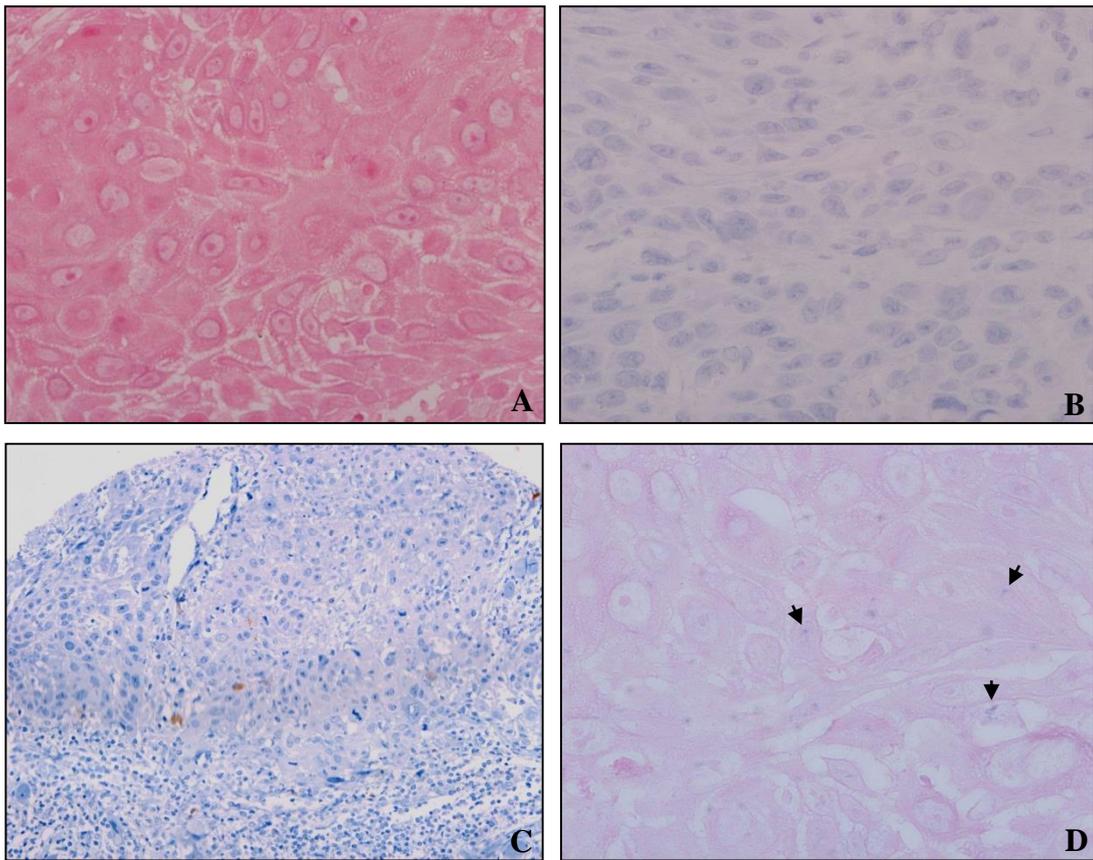


Figura 12. Caso de câncer da cavidade oral CO3. (A) ISH para HPVs de alto-risco; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7, ambas mostradas em aumento de 60X; (C) IHQ para p16INK4a mostrada em aumento de 20X; (D) ISH com setas indicando os sinais de HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 100X.

- **Caso CO4 (HPV18)**

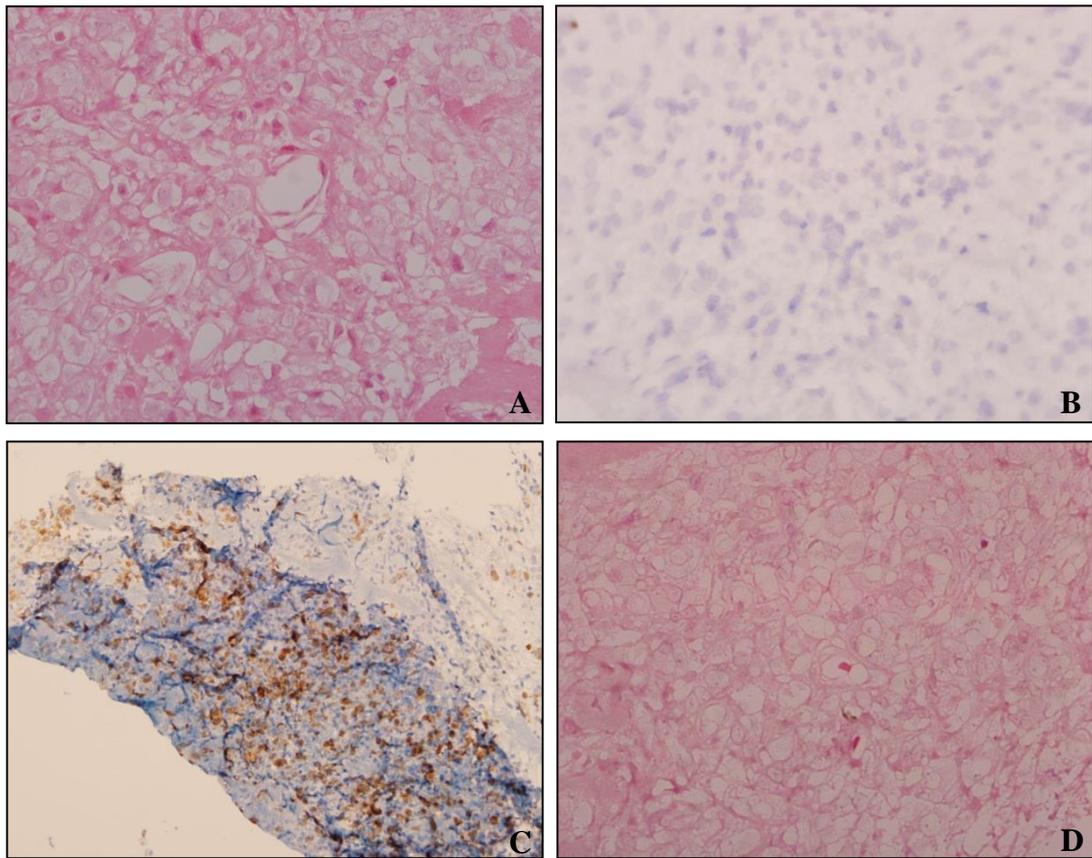


Figura 13. Caso de câncer da cavidade oral CO4. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 60X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4a mostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso CO5 (HPV16)**

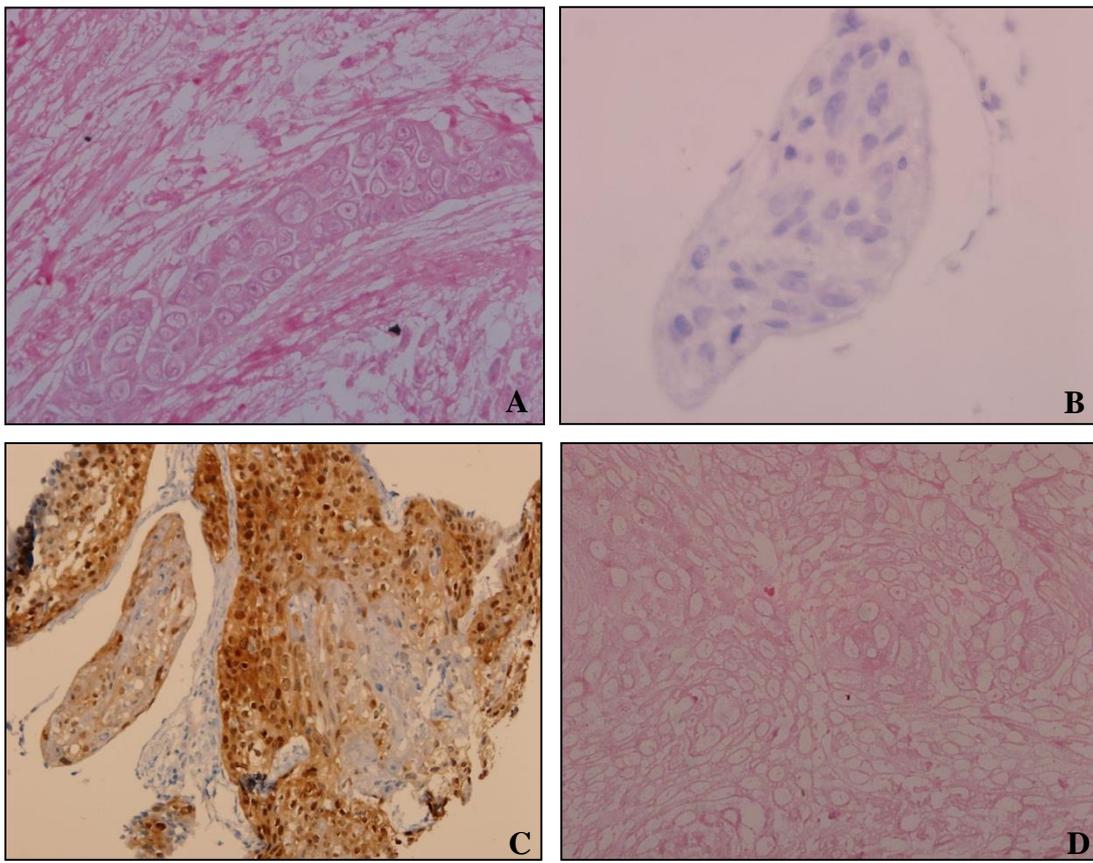


Figura 14. Caso de câncer da cavidade oral CO5. (A) ISH para HPVs de alto-risco; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7, ambas mostradas em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4a mostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso CO6 (HPV18)**

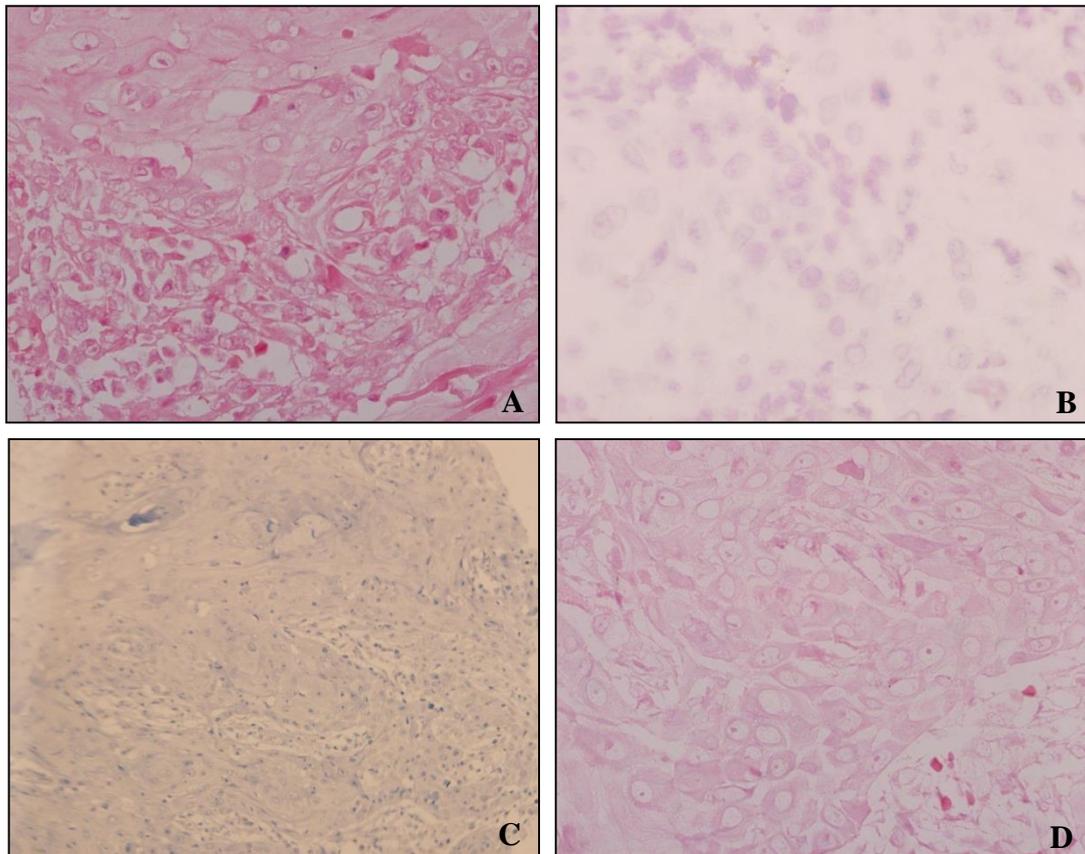


Figura 15. Caso de câncer da cavidade oral CO6. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 60X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4a mostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- Casos de câncer da cavidade oral HPV- por PCR e ISH e p16INK4a positivos

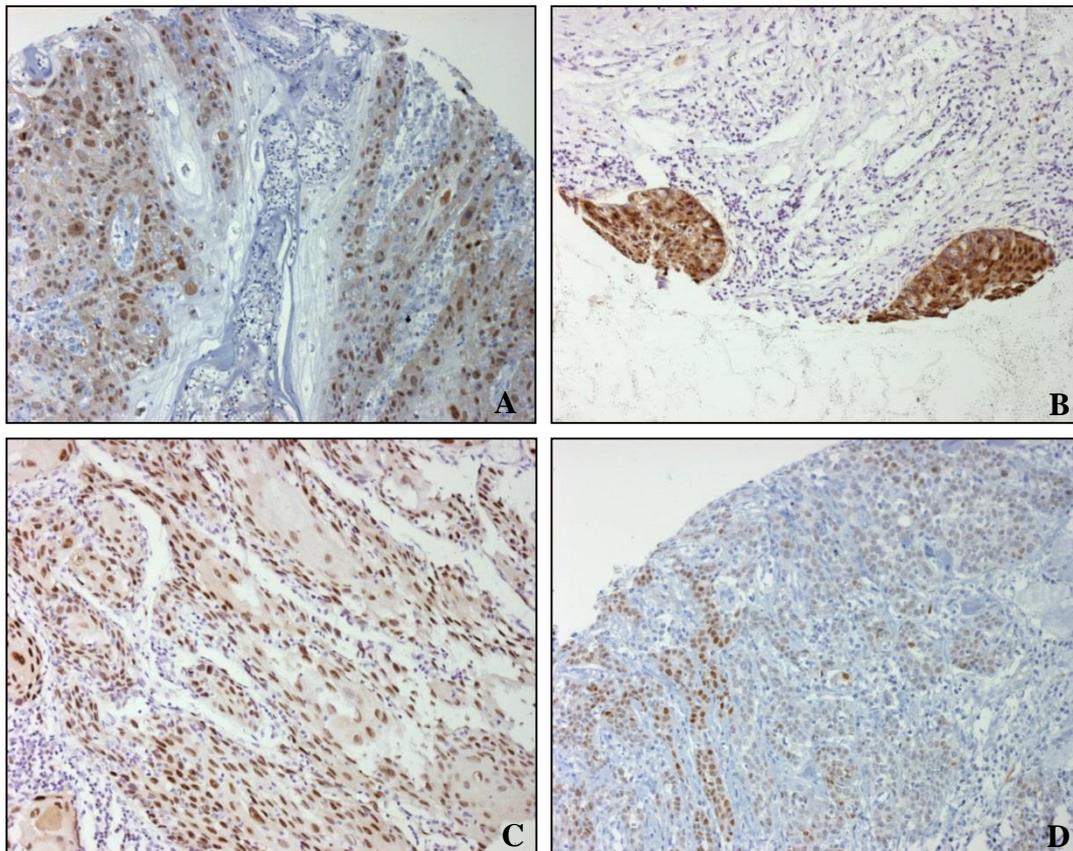


Figura 16. Expressão de p16INK4a de casos de câncer da cavidade oral HPV negativos por PCR e ISH. (A) caso CO7, (B) caso CO8, (C) caso CO9, (D) caso CO10, todos mostrados em aumento de 20X.

5.3.3. Casos de câncer de orofaringe

Os resultados das hibridizações *in situ* para DNA de alto e baixo-risco do HPV, RNA das proteínas virais E6 e E7 e imuno-histoquímica para p16INK4a dos 13 casos de câncer de orofaringe (COro) positivos por PCR foram mostrados na tabela 18. Destes casos (COro1 a COro13), 9 foram também positivos para a ISH de DNA de HPV de alto-risco (Figuras 18A, 19A, 20A, 21A, 23A, 24A, 25A, 28A e 29A). Adicionalmente, o caso COro8, sugestivo de co-infecção por diferentes cepas de HPV por sequenciamento, mostrou também positividade na ISH para HPV de baixo-risco (Figura 24D).

A expressão dos transcritos virais E6 e E7 foi detectada em sete casos de câncer de orofaringe HPV positivos por PCR e ISH de alto-risco (Figuras 18B, 19B, 20B, 24B, 25B, 28B e 29B). Dos casos de câncer de orofaringe com infecção ativa por HPV, observamos que 85,7 % (6/7) foram associados à presença do HPV16, sendo o outro caso positivo para HPV35.

A expressão de p16INK4a nos casos de câncer de orofaringe foi verificada em 11 casos, dos quais 8 foram positivos para HPV por PCR e ISH de alto-risco (COro2, COro3 COro4, COro7, COro8, COro9, COro12 e COro13), um foi positivo somente por PCR (COro6) e os demais dois casos (COro14 e COro15) foram HPV negativos por PCR e ISH (Figura 27). Os demais casos de COro analisados nesse estudo foram negativos para as hibridizações *in situ* para DNA de alto e baixo-risco do HPV, RNA das proteínas virais E6 e E7 e imuno-histoquímica para p16INK4a.

Tabela 18. Tipos de HPV encontrados por sequenciamento, detecção de DNA de HPV e de RNA das proteínas virais E6/E7 por hibridização *in situ* e imuno-histoquímica para p16INK4a para os casos de câncer de orofaringe positivos por PCR.

Casos de câncer de orofaringe	Tipo de HPV	ISH alto-risco	ISH baixo-risco	ISH E6E7	IHQ p16INK4a
COro1	HPV RTRX3	-	-	-	-
COro2	HPV16	+	-	+	+
COro3	HPV16	+	-	+	+
COro4	HPV16	+	-	+	+
COro5	HPV16	+	-	-	-
COro6	HPV16	-	-	-	+
COro7	HPV59	+	-	-	+
COro8	HPV16	+	+	+	+
COro9	HPV16	+	-	+	+
COro10	HPV16	-	-	-	-
COro11	HPV6	-	-	-	-
COro12	HPV35	+	-	+	+
COro13	HPV16	+	-	+	+

- **Caso COro1 (HPV RTRX3)**

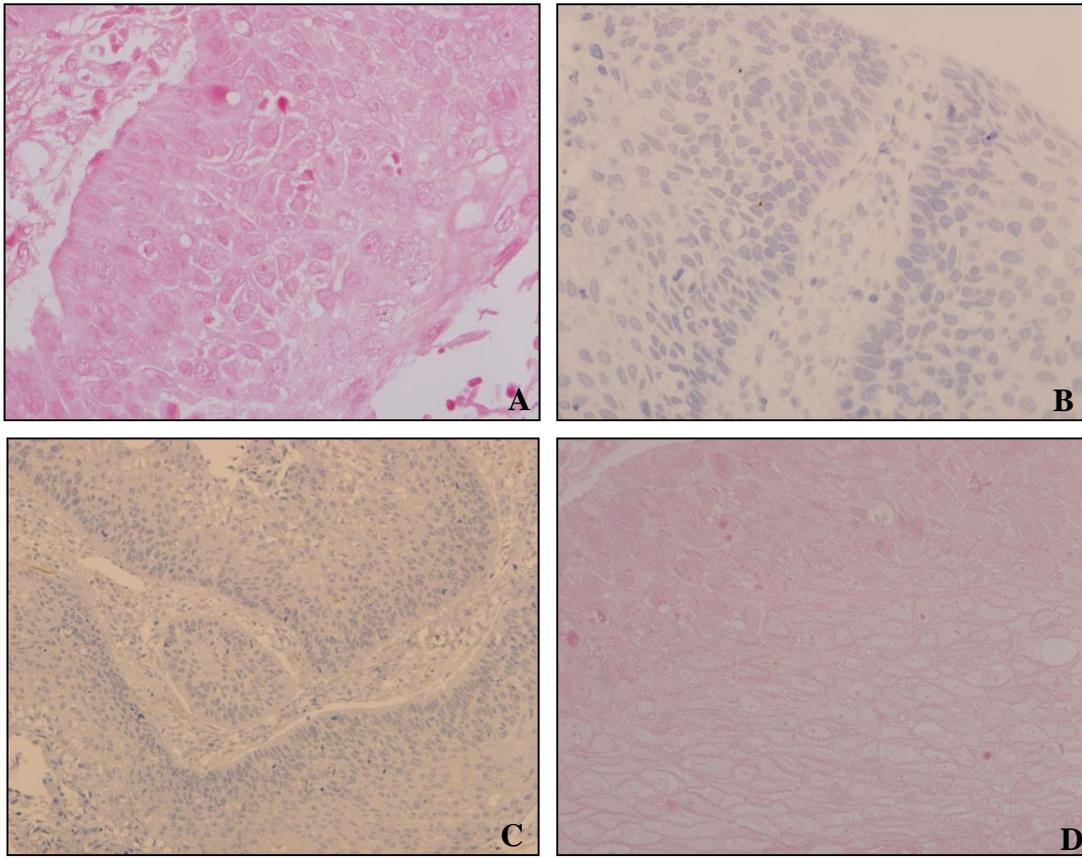


Figura 17. Caso de câncer de orofaringe COro1. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 60X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4a mostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro2 (HPV16)**

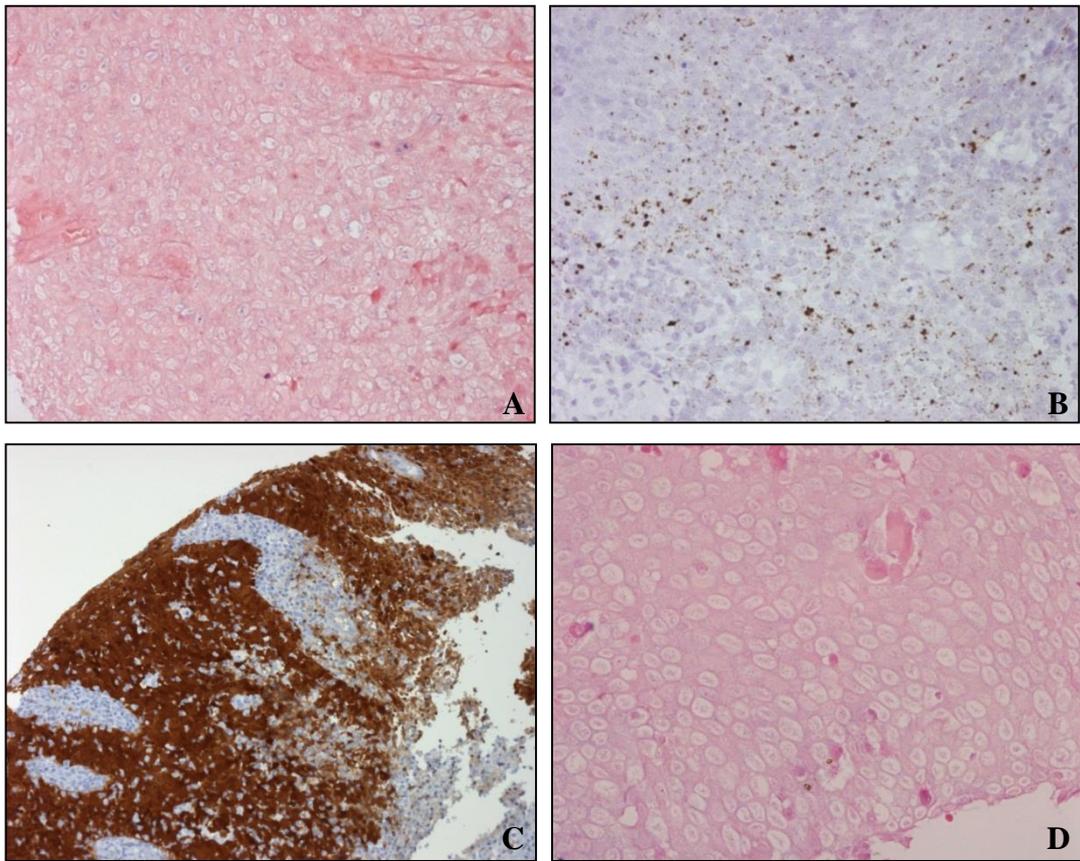


Figura 18. Caso de câncer de orofaringe COro2. (A) ISH para HPVs de alto-risco; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7, ambas mostradas em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4a mostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro3 (HPV16)**

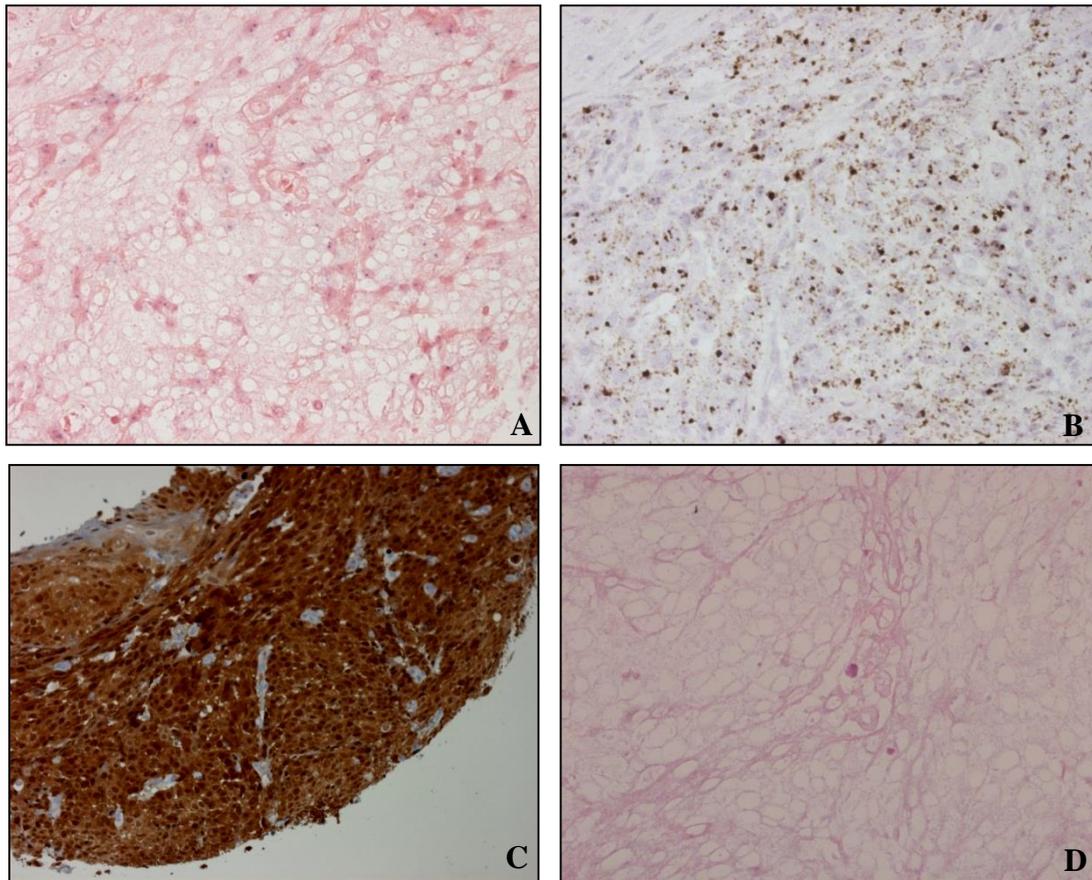


Figura 19. Caso de câncer de orofaringe COro3. (A) ISH para HPVs de alto-risco; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7, ambas mostradas em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4a mostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro4 (HPV16)**

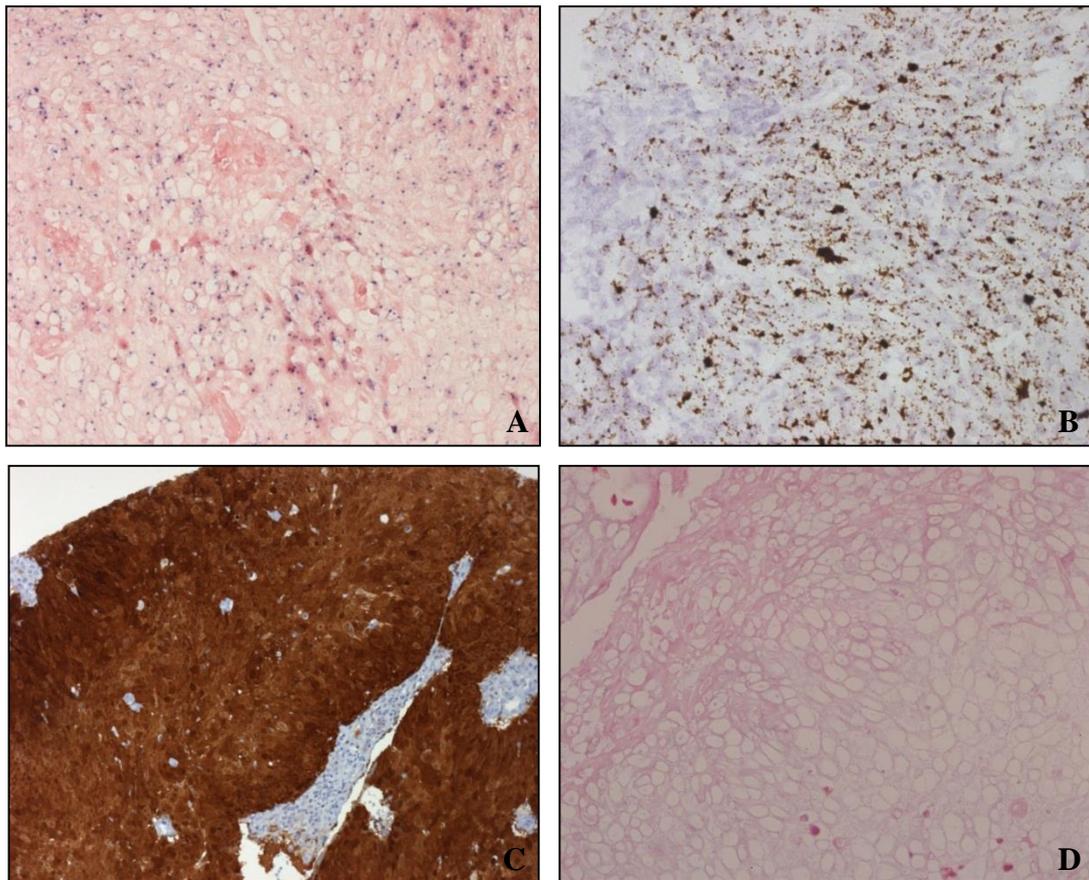


Figura 20. Caso de câncer de orofaringe COro4. (A) ISH para HPVs de alto-risco; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7, ambas mostradas em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro5 (HPV16)**

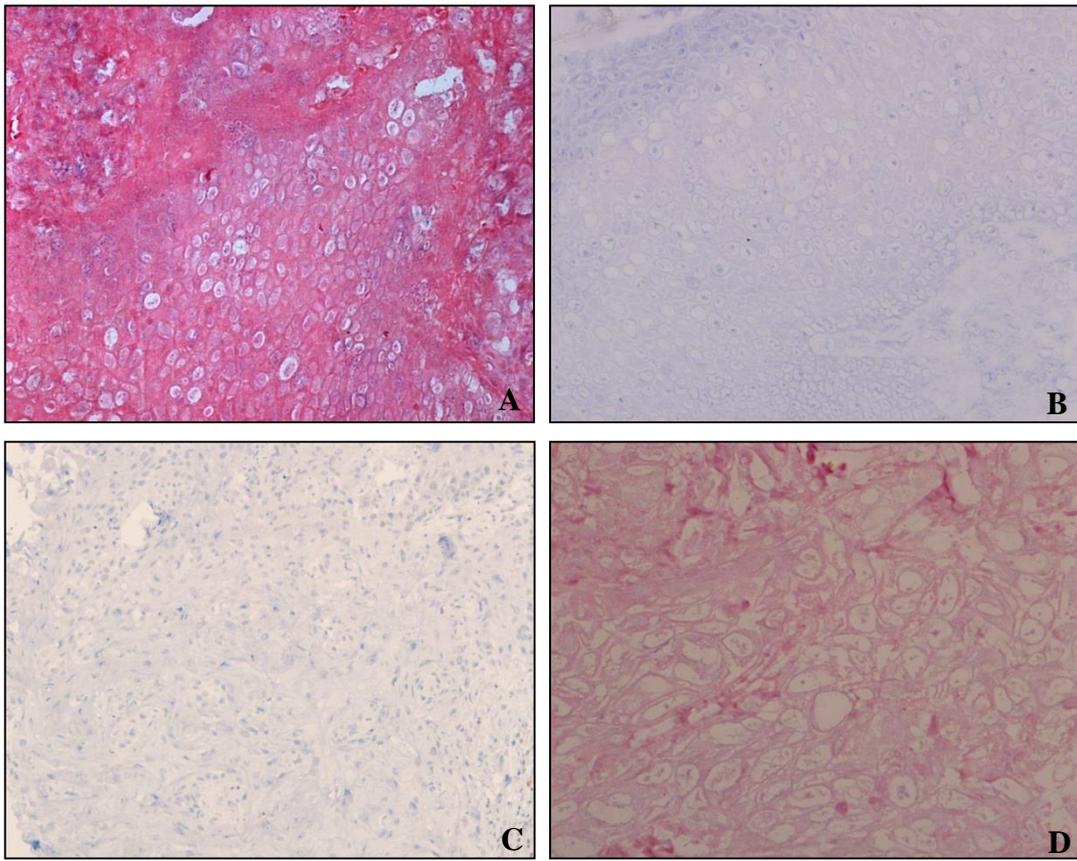


Figura 21. Caso de câncer de orofaringe COro5. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 40X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 60X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro6 (HPV16)**

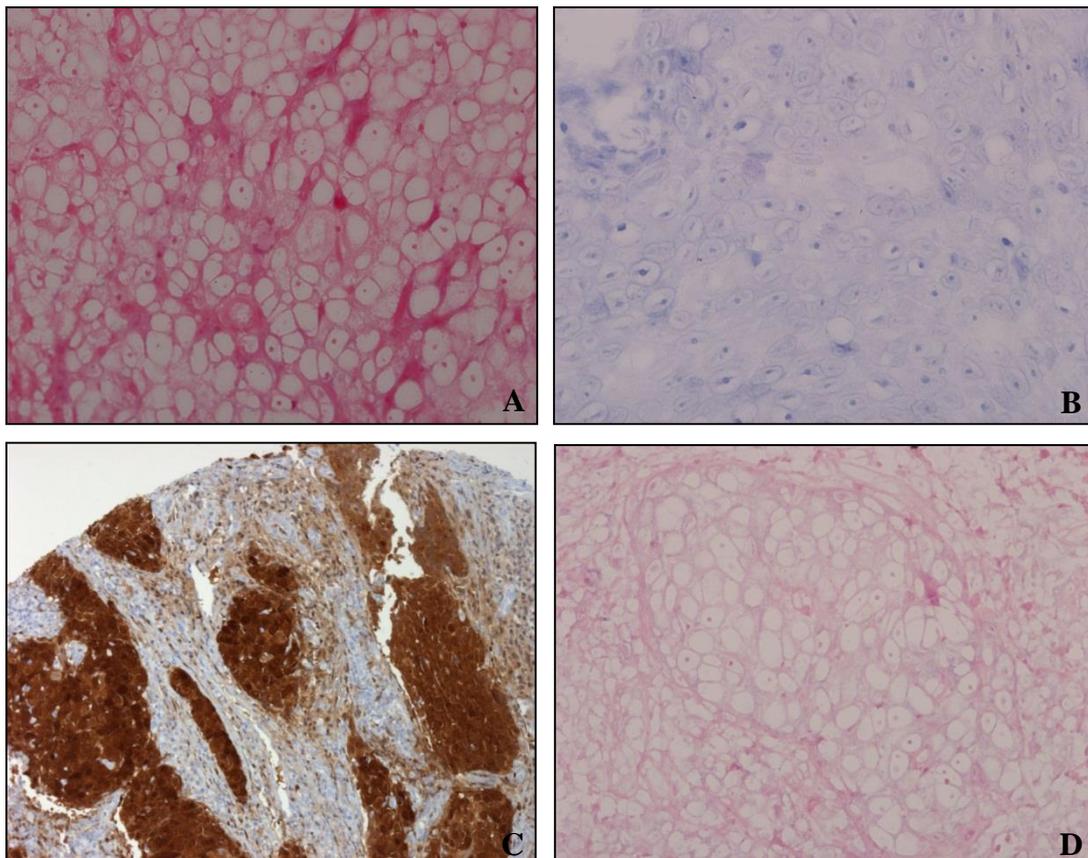


Figura 22. Caso de câncer de orofaringe COro6. (A) ISH para HPVs de alto-risco; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7, ambas mostrada em aumento de 60X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro7 (HPV59)**

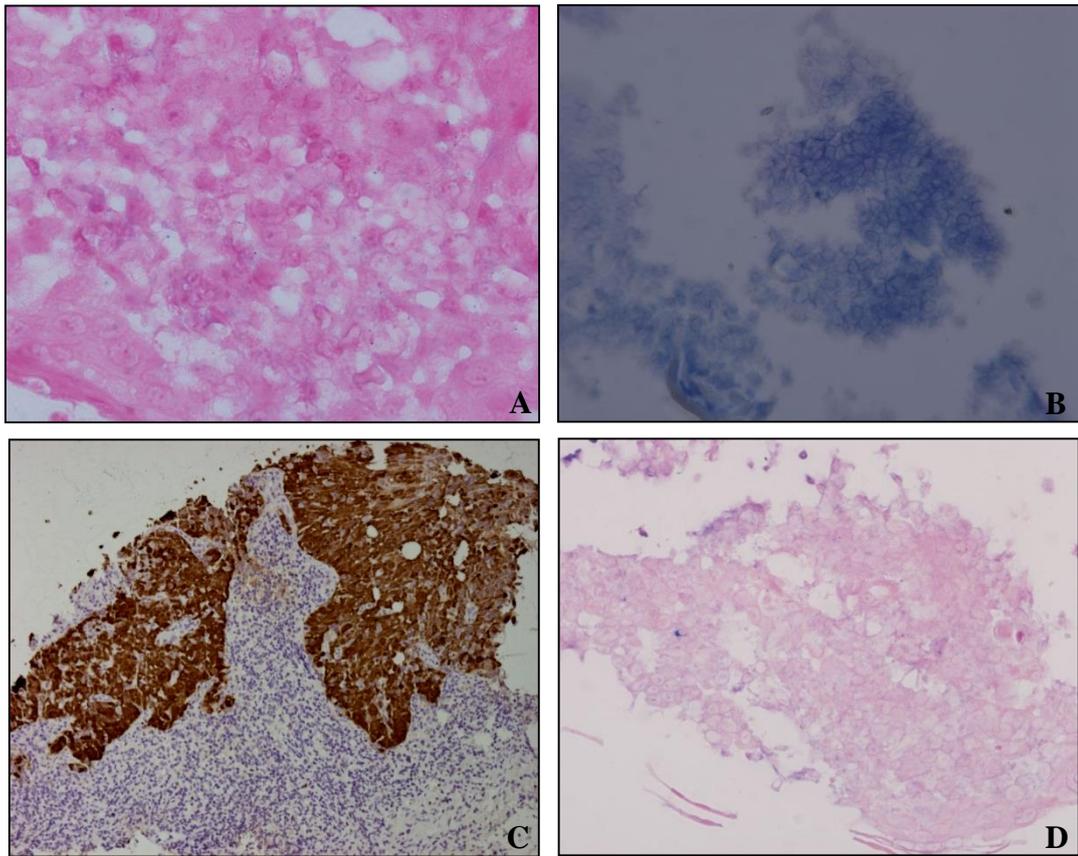


Figura 23. Caso de câncer de orofaringe COro7. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 100X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 60X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro8 (HPV16 por blast)**

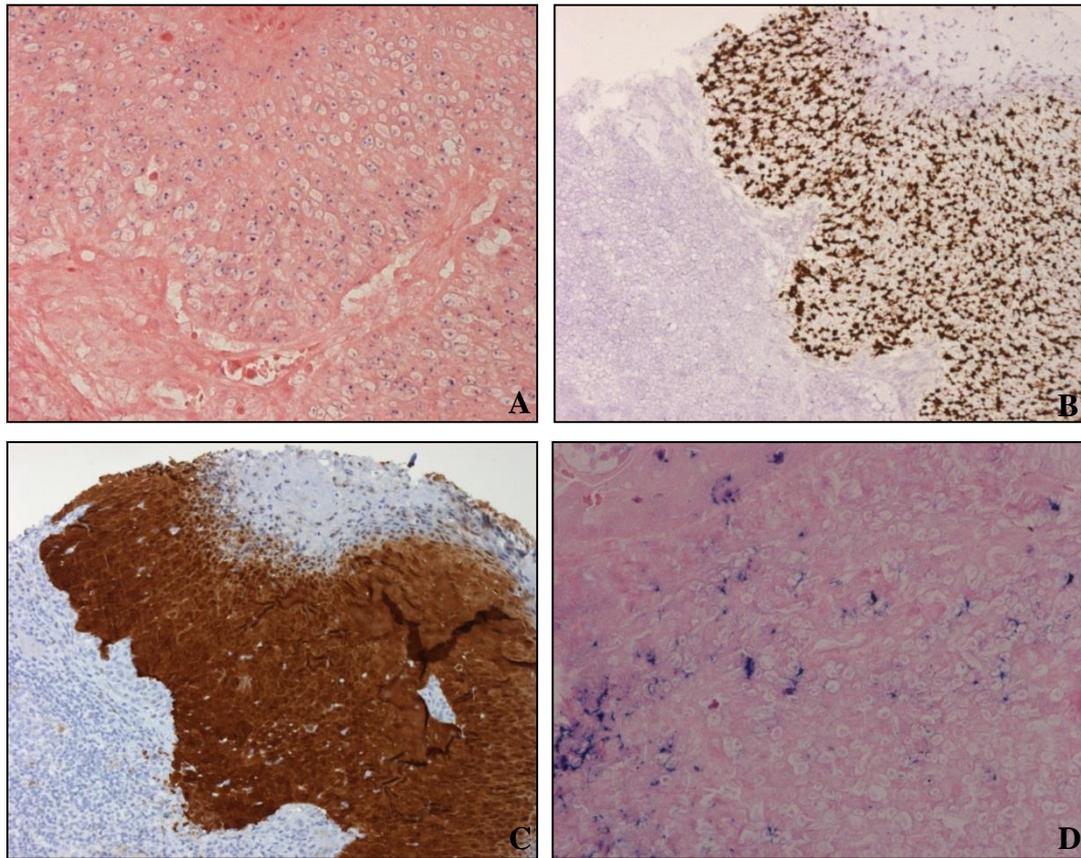


Figura 24. Caso de câncer de orofaringe COro8. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 40X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 20X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro9 (HPV16)**

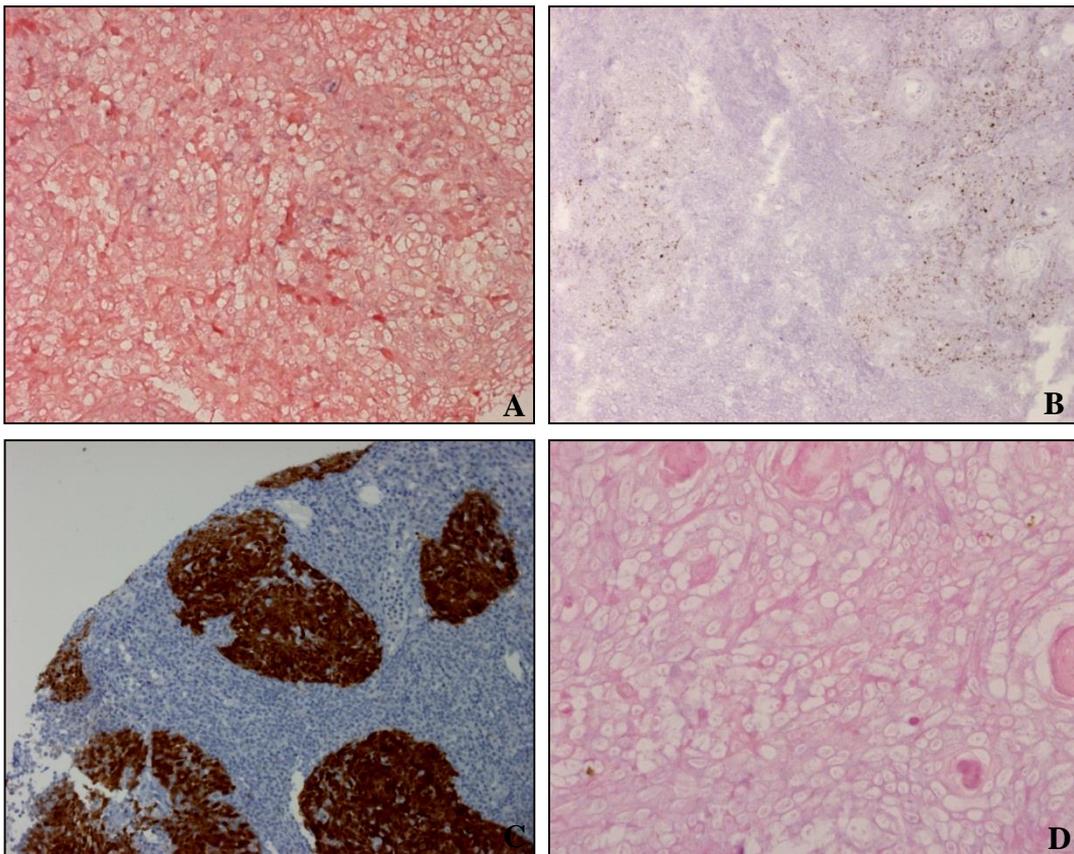


Figura 25. Caso de câncer de orofaringe COro9. (A) ISH para HPVs de alto-risco; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7, ambas mostradas em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro10 (HPV16)**

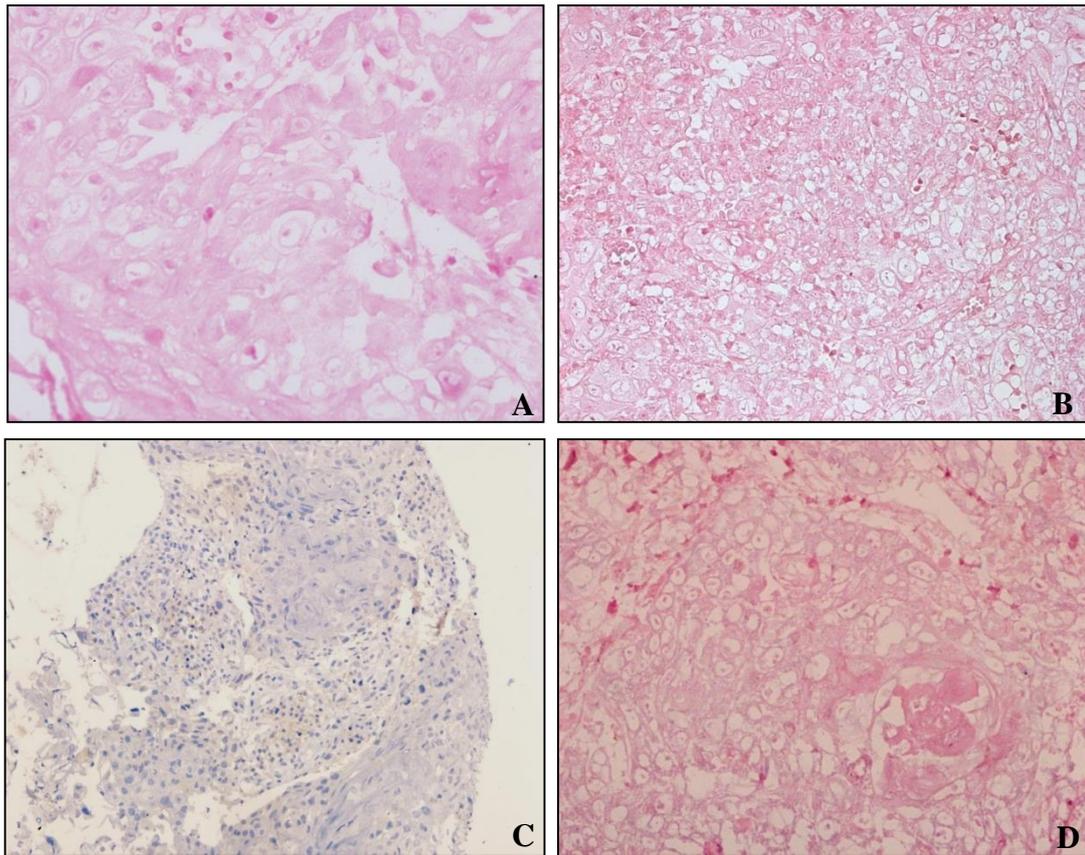


Figura 26. Caso de câncer de orofaringe COro10. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 60X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro11 (HPV6)**

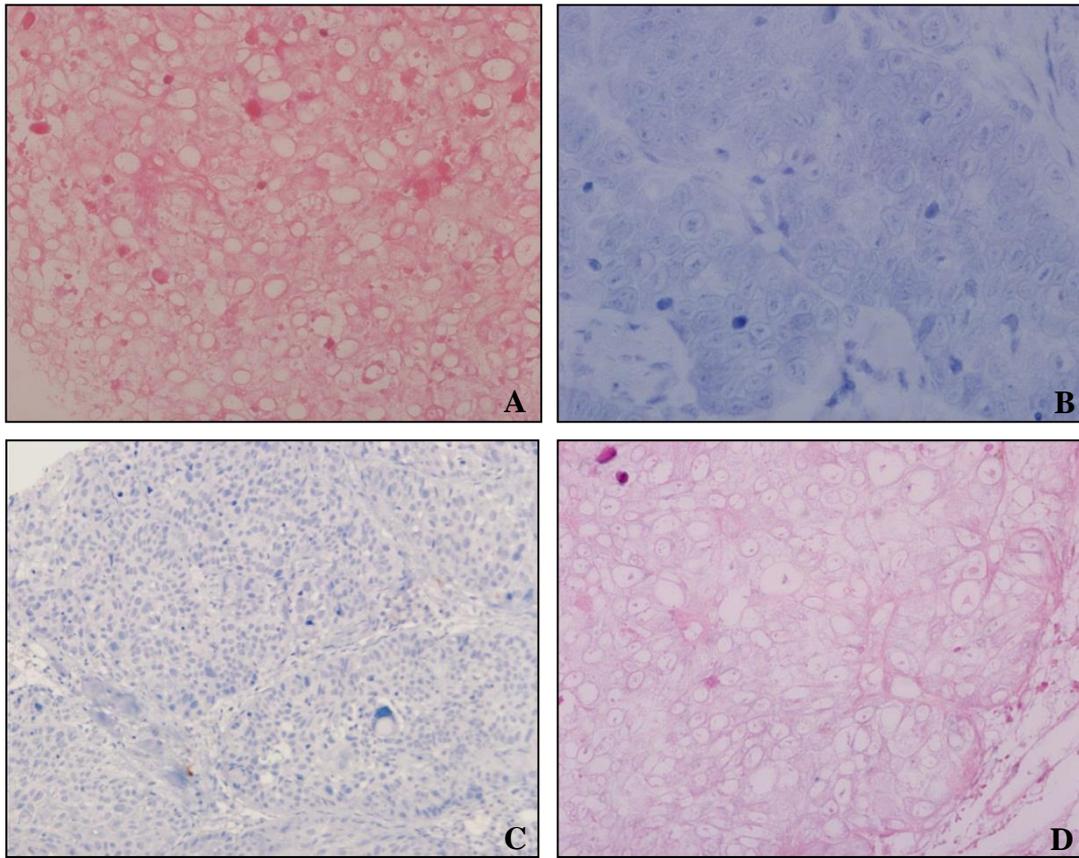


Figura 27. Caso de câncer de orofaringe COro11. (A) ISH para HPVs de alto-risco; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 ambas mostradas em aumento de 60X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro12 (HPV35)**

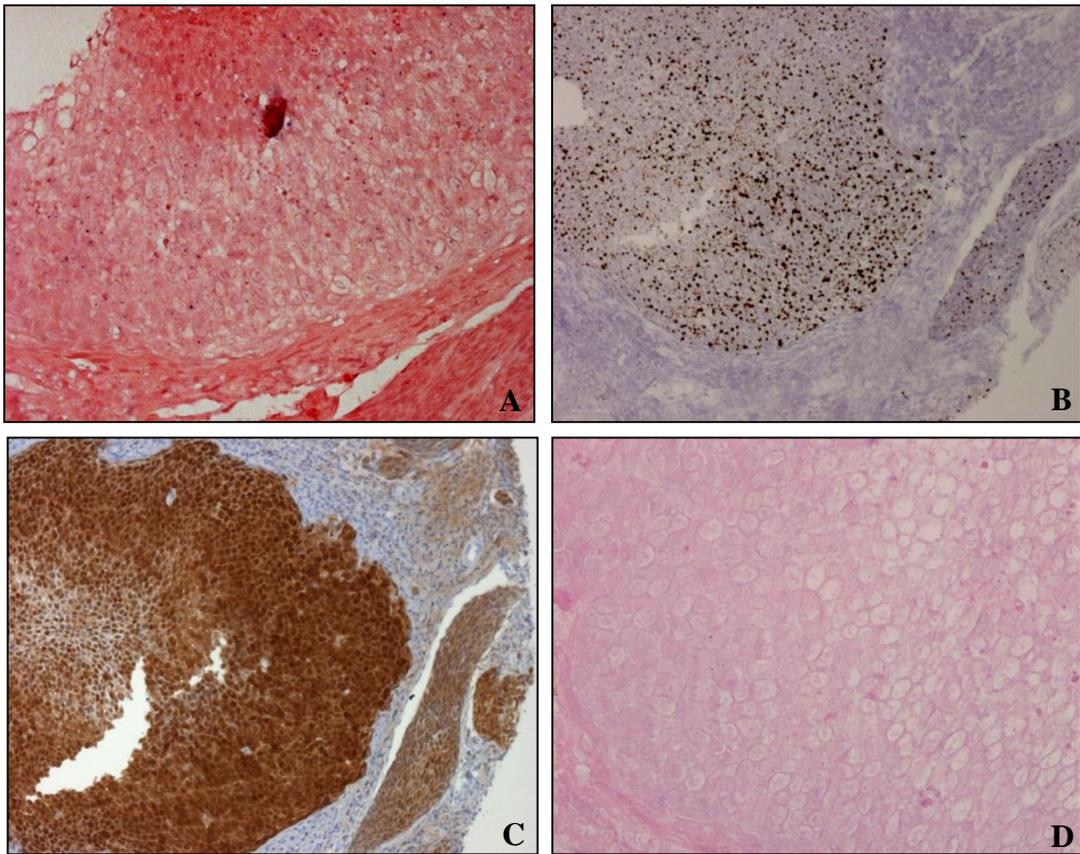


Figura 28. Caso de câncer de orofaringe COro12. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 40X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 20X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso COro13 (HPV16)**

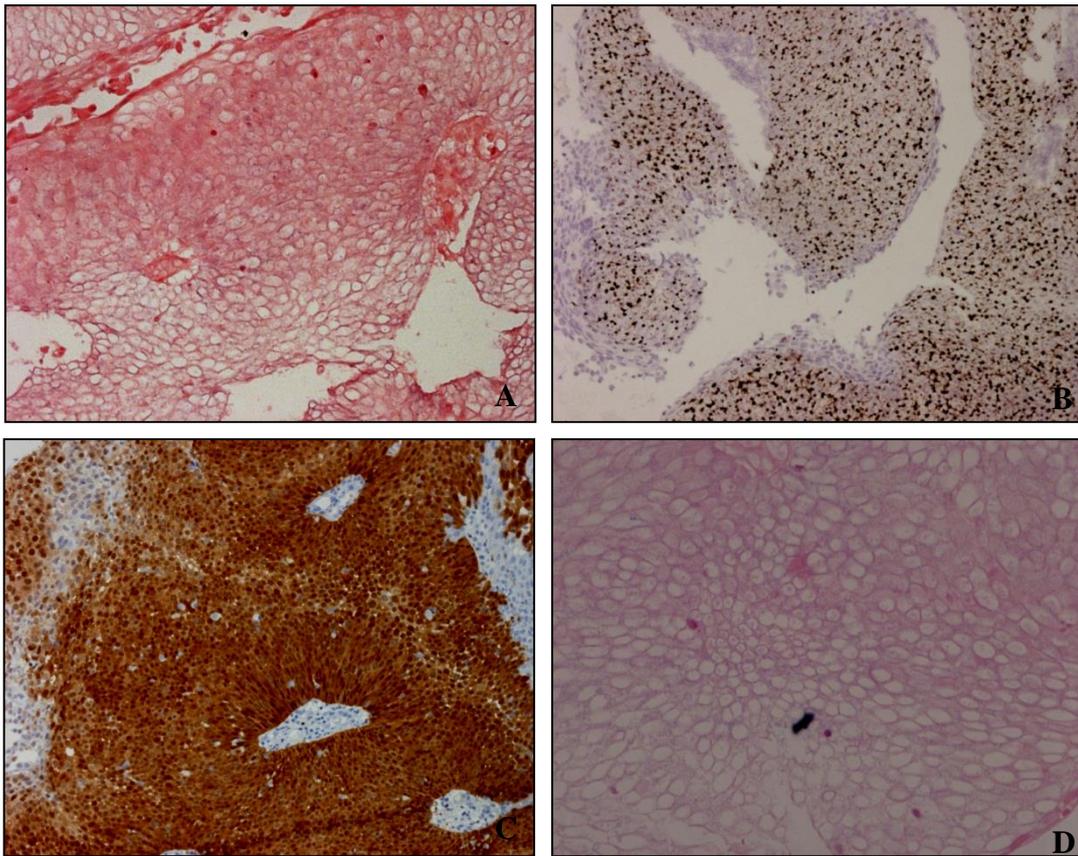


Figura 29. Caso de câncer de orofaringe COro13. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 40X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 20X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- Casos de câncer de orofaringe HPV- por PCR e ISH e p16INK4a positivos

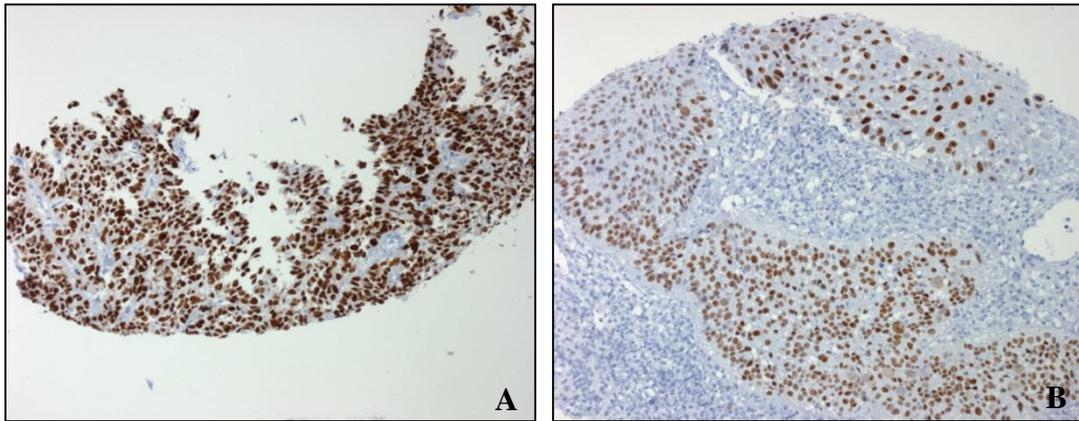


Figura 30. IHQ para p16INK4a de casos de câncer de orofaringe HPV negativos por PCR e ISH. (A) caso COro14, (B) caso COro15, ambos mostrados em aumento de 20X.

5.3.4. Casos de câncer de hipofaringe/laringe

Os resultados das hibridizações *in situ* para DNA de alto e baixo-risco do HPV, RNA das proteínas virais E6 e E7 e imuno-histoquímica para p16INK4a dos cinco casos de câncer de hipofaringe/ laringe (CHL) positivos por PCR (CHL1 a CHL5) foram mostrados na tabela 19. Destes casos, dois foram positivos para ISH de DNA de HPV de alto-risco (Figuras 32A e 34A) e um foi positivo para ISH de DNA de HPV de baixo-risco (Figura 33D).

A expressão de p16INK4a nos casos de câncer de hipofaringe/ laringe foi verificada somente para dois casos negativos para HPV por PCR e ISHs. Todos os demais casos de câncer de hipofaringe/laringe foram negativos para as hibridizações *in situ* para DNA de alto e baixo-risco do HPV, RNA das proteínas virais E6 e E7 e imuno-histoquímica para CDKN2A.

Tabela 19. Tipos de HPV encontrados por sequenciamento, detecção de DNA de HPV e de RNA das proteínas virais E6/E7 por hibridização *in situ* e imuno-histoquímica para p16INK4a para os casos de câncer de hipofaringe/ laringe positivos por PCR.

Casos de câncer de hipofaringe/laringe	Tipo de HPV	ISH alto-risco	ISH baixo-risco	ISH E6E7	IHQ CDKN2A
CHL1	HPV6	-	-	-	-
CHL2	HPV16	+	-	-	-
CHL3	HPV6	-	+	-	-
CHL4	HPV16	+	-	-	-
CHL5	HPV73	-	-	-	-

- **Caso CHL1 (HPV6)**

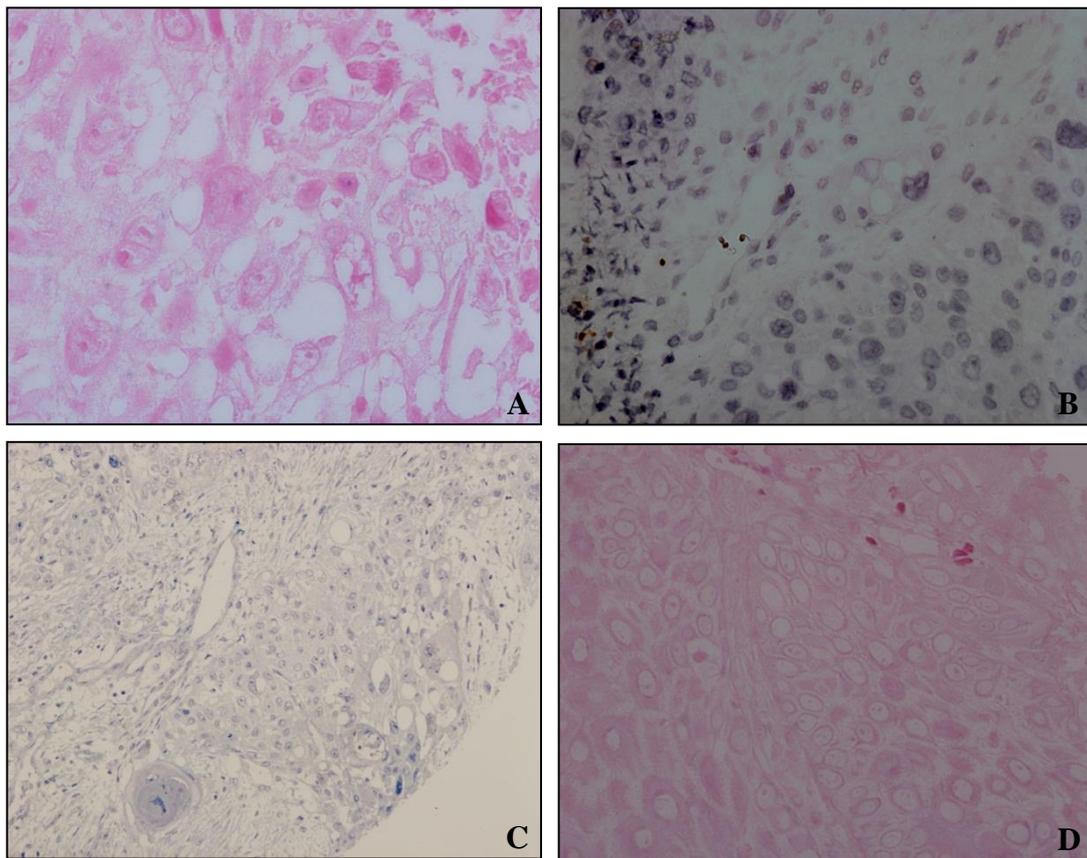


Figura 31. Caso de câncer de hipofaringe/laringe CHL1. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 100X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 60X.

- **Caso CHL2 (HPV16)**

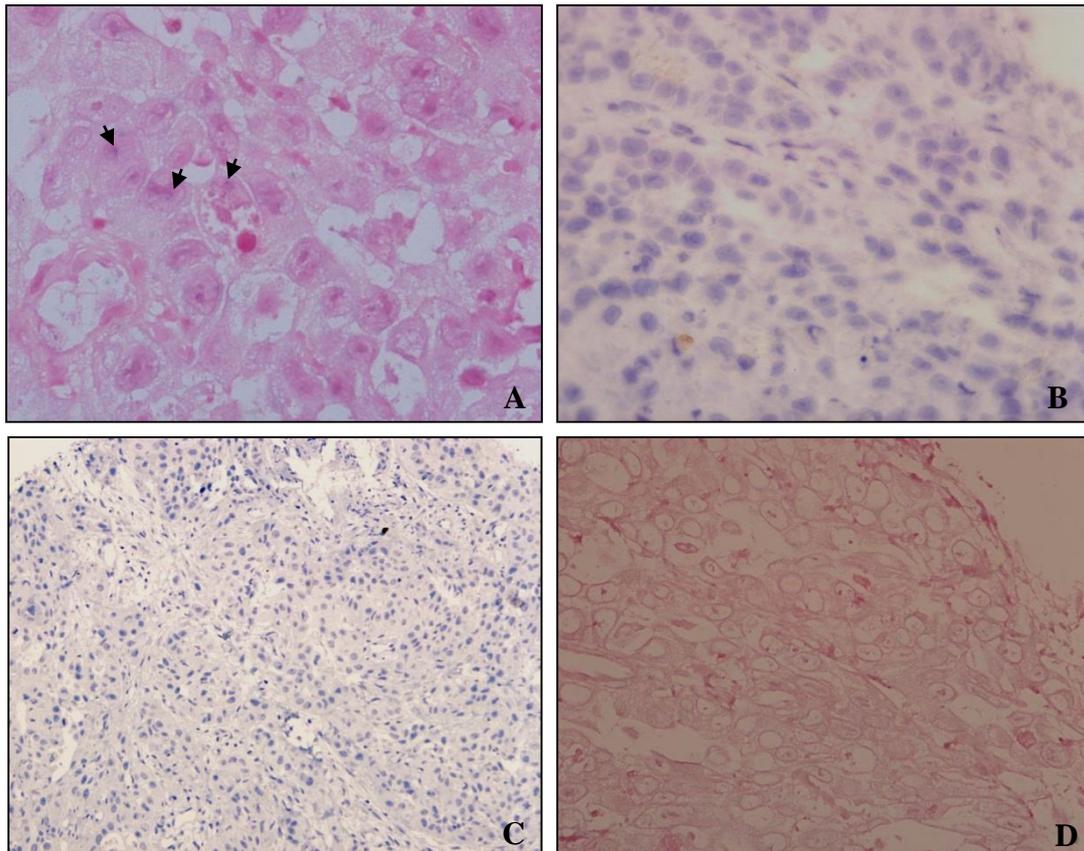


Figura 32. Caso de câncer hipofaringe/laringe CHL2. (A) ISH com setas indicando sinais de HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 100X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X.

- **Caso CHL3 (HPV6)**

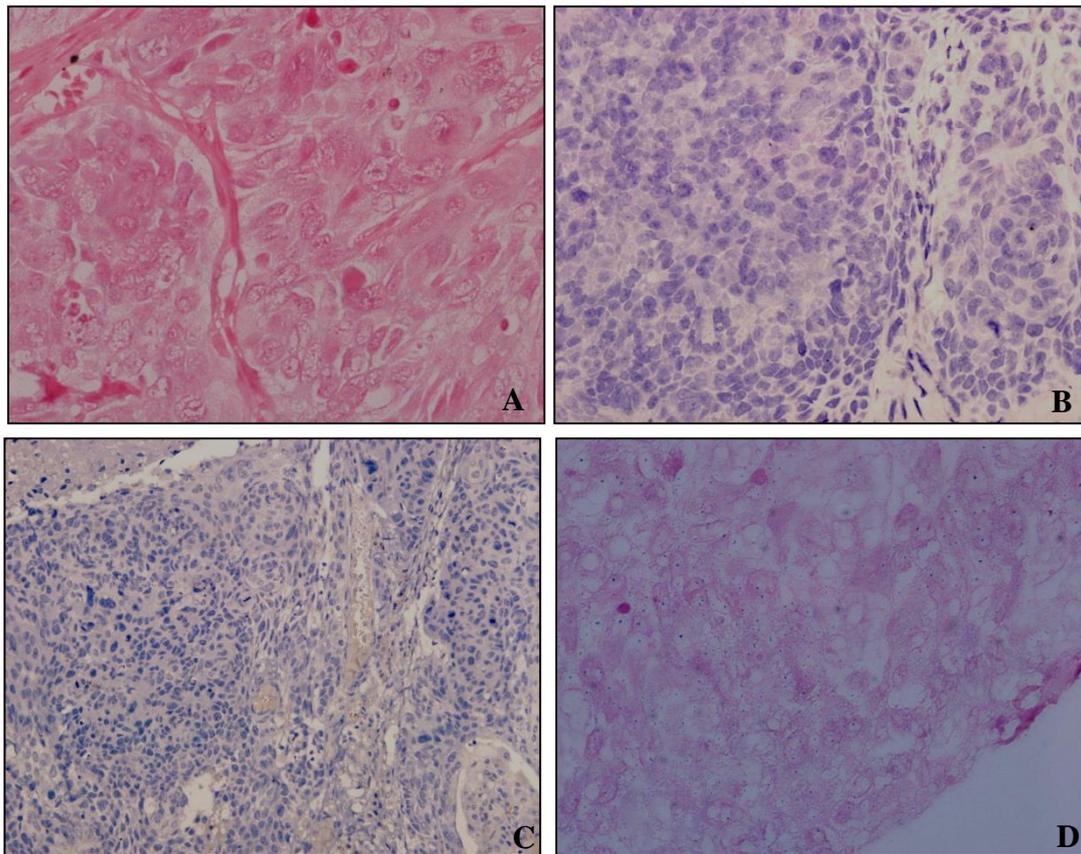


Figura 33. Caso de câncer de hipofaringe/laringe CHL3. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 60X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7, mostradas em aumento de 40X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X; (D) ISH para HPVs de baixo-risco mostrada em aumento de 100X.

- **Caso CHL4 (HPV16)**

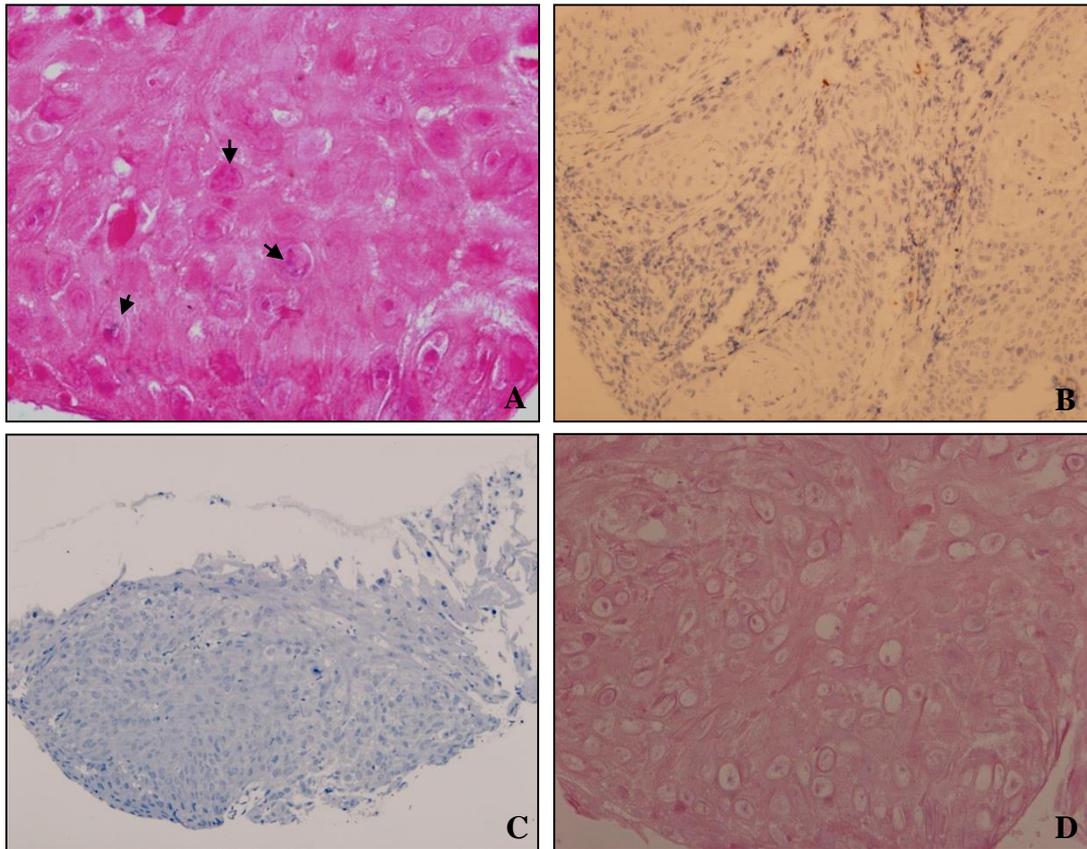


Figura 34. Caso de câncer de hipofaringe/laringe CHL4. (A) ISH com setas indicando sinais de HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 100X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 20X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X.

- **Caso CHL5 (HPV73)**

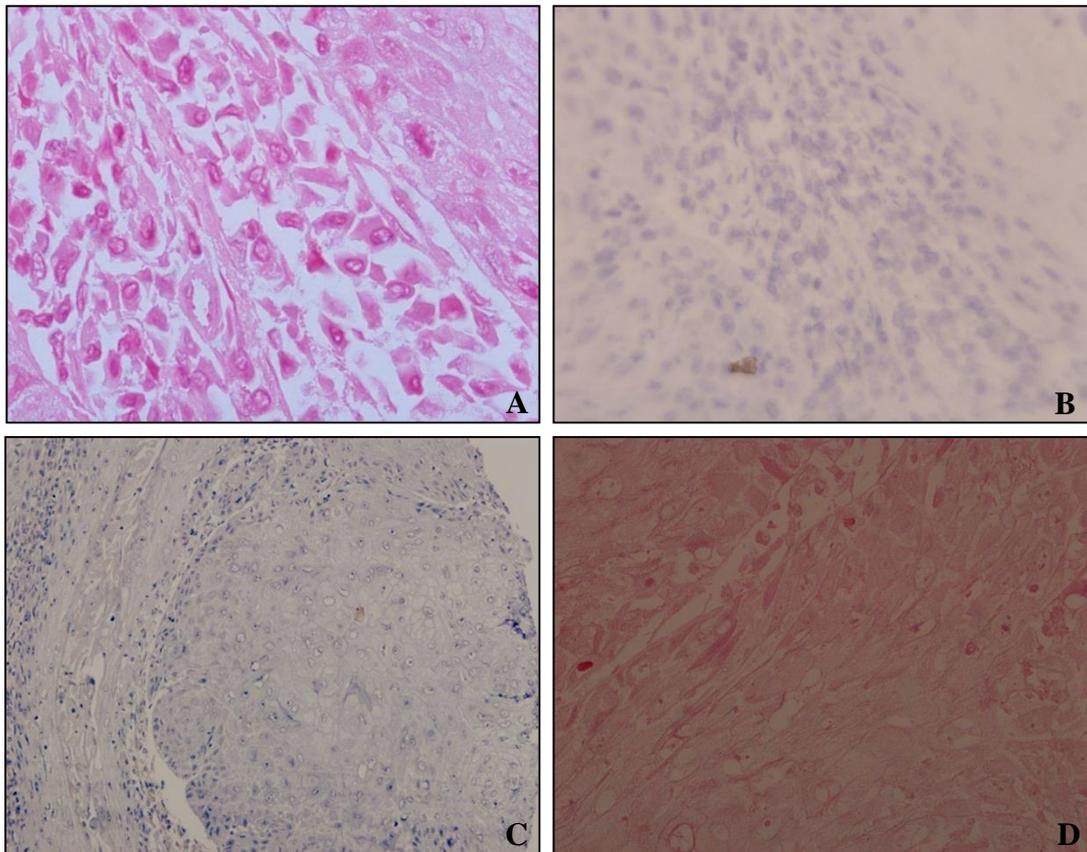


Figura 35. Caso de câncer de hipofaringe/laringe CHL5. (A) ISH para HPVs de alto-risco mostrada em aumento de 100X; (B) expressão dos transcritos virais E6 e E7 mostrada em aumento de 20X; (C) IHQ para p16INK4 amostrada em aumento de 20X.

- Casos de câncer de hipofaringe/ laringe HPV- por PCR e ISH e p16INK4a positivos

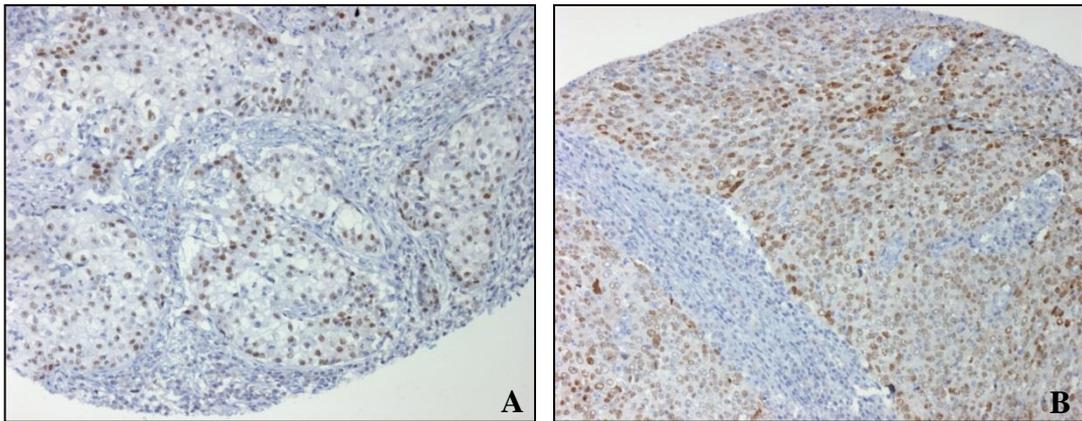


Figura 36. Superexpressão de p16INK4a em casos de câncer de hipofaringe/ laringe HPV negativos por PCR e ISH. (A) caso CHL6, (B) caso CHL7, ambos mostrados em aumento de 20X.

5.4. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade dos testes para detecção do HPV e superexpressão de p16INK4a

As estimativas de concordância, sensibilidade e especificidade entre os testes para detecção de DNA de HPV (ambos, alto e baixo-risco) e RNA viral dos genes E6/E7 por hibridização *in situ* e superexpressão de p16INK4a em relação à metodologia padrão-ouro para detecção de HPV por PCR foi calculada para cada topografia de tumor (Câncer de cabeça e pescoço, Anexo 16; Câncer da cavidade oral, Anexo 17; Câncer de orofaringe, Anexo 18; Câncer de hipofaringe/ laringe, Anexo 19). As estimativas de estatística Kappa compiladas (Tabela 20) mostram uma maior concordância entre as metodologias de PCR e ISHs que nas demais comparações. Além disso, uma maior concordância dos resultados foi observada para as análises de câncer de orofaringe que nos cânceres de cabeça e pescoço, cavidade oral ou hipofaringe/ laringe.

Tabela 20. Concordância entre a detecção do HPV por PCR em relação à identificação de DNA e RNA por ISH e IHQ para p16INK4a mostrada por topografia de tumor.

Topografia do tumor	Concordância (%)		
	ISH		IHQ
	DNA de HPV	RNA de E6E7	CDKN2A
Cabeça e pescoço	74,9	42,4	42,3
Cavidade oral	65,0	-	12,4
Orofaringe	78,6	65,5	69,9
Hipofaringe/ laringe	73,7	-	-4,2

A análise de concordância entre a superexpressão de p16INK4a e o teste para identificação de infecções ativas por HPV foi de 74,7%, mostrando uma maior concordância em relação à observada entre p16INK4a e detecção de DNA por PCR (69,9%).

As análises de sensibilidade mostraram valores acima de 50% entre ISHs (alto e baixo-risco) e PCR nas comparações das diferentes topografias de tumor (Anexos 16 a 19). No entanto, valores abaixo de 30% de sensibilidade foram verificados para as análises das proteínas virais E6/E7 em relação à PCR (Anexos 16, 17 e 19), exceto para os casos de câncer de orofaringe que mostraram uma sensibilidade de 53,8% para este marcador (Anexo 18).

Em relação à superexpressão de p16INK4a e a positividade para HPV por PCR, a sensibilidade observada para os casos de câncer de orofaringe foi de 69,2% (Anexo 18), sendo muito reduzida nas demais comparações para os casos de câncer da cavidade oral (16,7%; Anexo 17) e de hipofaringe/ laringe (0%; Anexo 19).

A especificidade das hibridizações *in situ* e imuno-histoquímica para p16INK4a em relação aos resultados obtidos por PCR mostraram valores acima de 93% para todas as comparações (Anexos 16 a 19).

Os valores preditivos positivos e negativos dos testes de IHQ para p16INK4a em relação à detecção do HPV por PCR nas diferentes topografias de tumor analisadas no presente estudo foram mostrados na Tabela 21. Estimativas acima de 80% foram observadas para todas as comparações em relação aos valores preditivos negativos, enquanto somente os casos de câncer de orofaringe mostraram um alto valor preditivo positivo entre a detecção do HPV por PCR e a expressão de p16INK4a.

Tabela 21. Valor preditivo positivo e negativo da superexpressão de p16INK4a por IHQ em relação aos resultados obtidos por PCR mostrados por topografia de tumor.

Topografia do tumor	Valor preditivo de p16INK4a	
	Positivo (%)	Negativo (%)
Cabeça e pescoço	0,56	0,93
Cavidade oral	0,20	0,94
Orofaringe	0,82	0,93
Hipofaringe/ laringe	0	0,93

5.5. Hibridizações *in situ* para detecção do vírus Epstein-Barr

A linhagem Raji mostrou a presença do EBV identificado através de pontos com coloração castanha nos núcleos das células tumorais (Figura 37A). As linhagens CaSki e HeLa, utilizadas como controles negativos para essa técnica, mostraram negatividade para o EBV (Figura 37B e 37C). No entanto, nenhum caso de câncer de cabeça e pescoço analisado nesse estudo foi positivo para ISH do EBV.

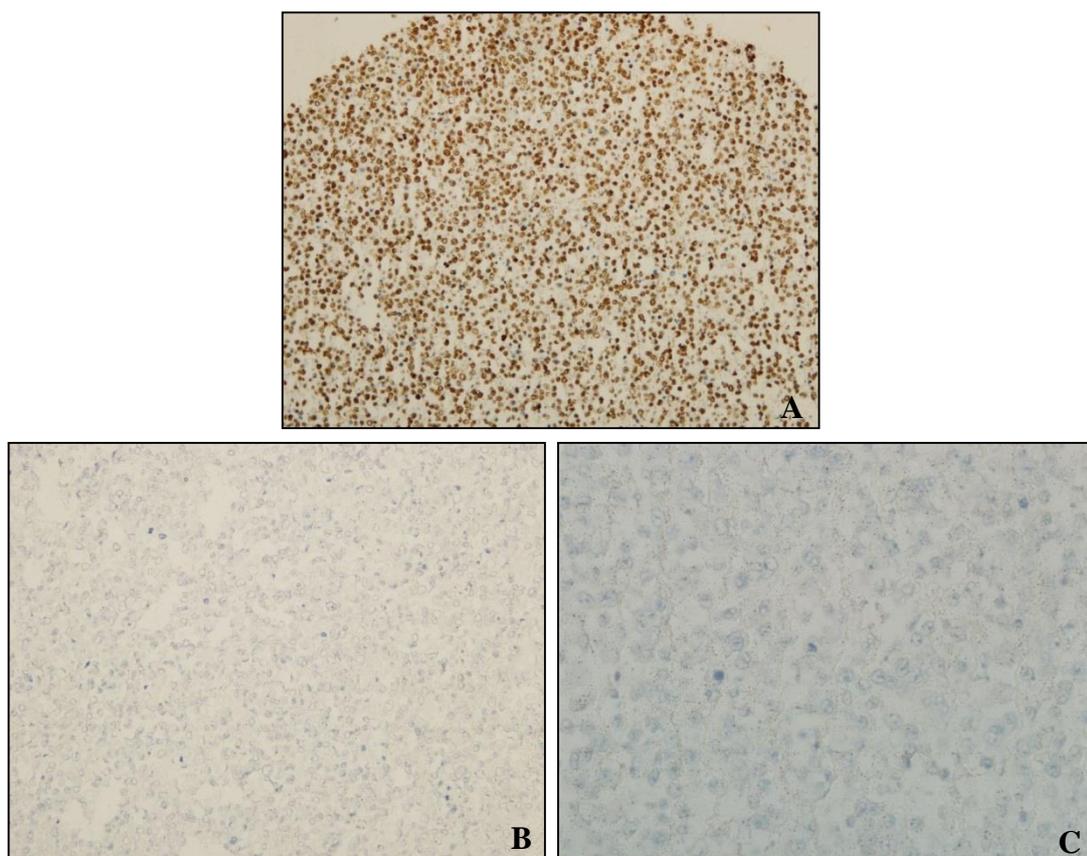


Figura 37. ISH para detecção de RNA de EBER1 do EBV. (A) células da linhagem Raji mostrada em aumento de 20X; (B) células da linhagem CaSki; (C) células da linhagem HeLa, ambas mostradas em aumento de 40X.

5.6. Análise das frequências e proporções dos tipos de HPV em mulheres com e sem lesão cervical e em casos de câncer e controles de orofaringe

Nas comparações dos grupos sem histórico de câncer, tanto cervical quanto de orofaringe, observamos uma maior frequência e proporção de HPV6 nos controles de orofaringe que em mulheres sem lesão cervical (Figura 38; $p=0,0001$). Apesar de uma similar frequência do HPV16 nas comparações dos grupos com câncer de orofaringe e com lesão cervical, uma maior proporção de casos HPV16 foi observada em indivíduos com câncer de orofaringe que em mulheres com lesão cervical (Figura 38; $p=0,017$).

Em relação ao HPV18, uma maior frequência e proporção de mulheres sem lesão cervical foram verificadas em comparação aos controles de orofaringe ($p=0,02$). Uma maior diversidade de tipos de HPV de alto-risco, exceto os HPV16 e HPV18, também foi observada na frequência e proporção de mulheres sem lesão cervical que nos controles de orofaringe (Figura 38; $p=0,004$).

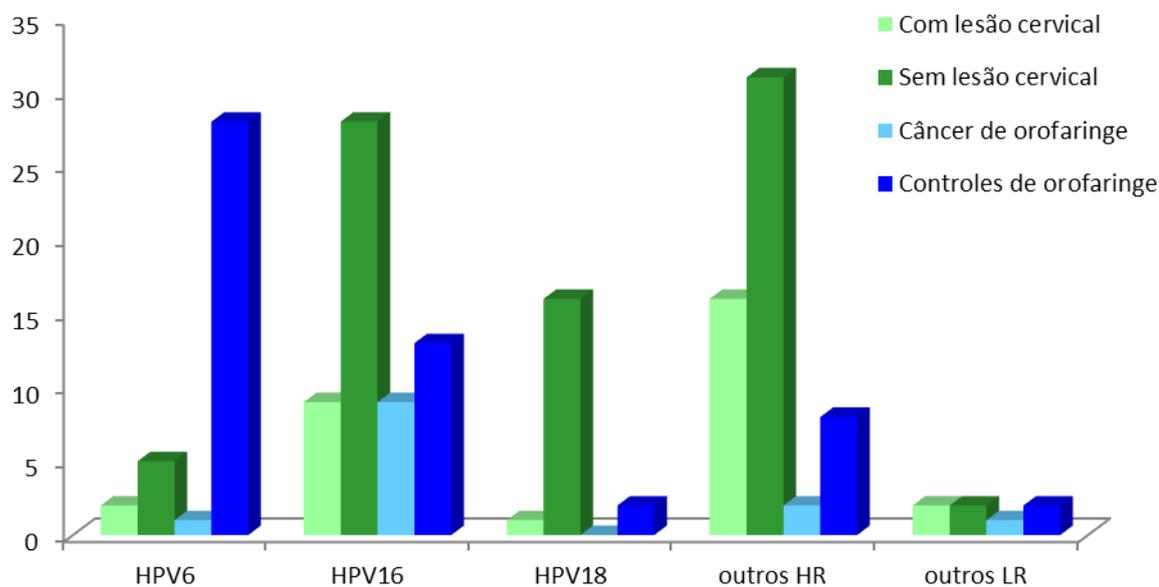


Figura 38. Frequência dos tipos de HPV em mulheres com ou sem lesão cervical e em casos de câncer e controles de orofaringe.

6. Discussão

6.1. Prevalência e atividade do HPV no câncer de cabeça e pescoço

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo no Brasil investigando simultaneamente a prevalência de DNA e atividade de oncoproteínas do HPV em casos de câncer de cabeça e pescoço. Os dados deste estudo mostram que a prevalência do HPV varia de acordo com o sítio anatômico dos tumores de cabeça e pescoço analisados. Assim como em outros estudos (Blomberg *et al.* 2011; Gillison 2004; Marklund & Hammarstedt 2011; Nasman *et al.* 2009), a maior prevalência do HPV foi observada para os casos de câncer de orofaringe, sendo cinco vezes mais frequente em comparação aos casos de câncer da cavidade oral e hipofaringe/ laringe, como encontrado previamente (Herrero *et al.* 2003). Estes achados confirmam que a análise de prevalência do HPV no câncer de cabeça e pescoço sem distinção dos sítios anatômicos pode representar uma fonte crítica de variação (Pannone *et al.* 2011; Termine *et al.* 2008), resultando em uma consequente dificuldade de comparação dos diferentes estudos.

Desde as primeiras observações da potencial associação entre o HPV na carcinogênese oral (Syrjanen *et al.* 1983), vários estudos tem mostrado distintas prevalências do HPV, variando de 4 a 40% para os carcinomas orais (Kreimer *et al.* 2005; Mork *et al.* 2001; Termine *et al.* 2008) e maiores proporções (de até 60% de positividade) para os casos de câncer de orofaringe (Ang *et al.* 2010; Hoffmann *et al.* 2012; Klusmann *et al.* 2001; Syrjanen 2004). A variação das prevalências do HPV nos distintos sítios de câncer de cabeça e pescoço pode estar relacionada a possíveis erros de classificação das áreas anatômicas analisadas, diferentes origens geográficas, tamanhos amostrais e ainda metodologias utilizadas para detecção do HPV. No entanto, a presença do HPV não é evidência suficiente para demonstrar a associação etiológica deste vírus no processo de carcinogênese, visto a necessidade de integração do DNA do HPV ao DNA hospedeiro e expressão dos transcritos virais E6 e E7 (Holzinger *et al.* 2009;

Rampias et al. 2009). Por isso, até o momento, a proporção de câncer de cabeça e pescoço etiologicamente associado ao HPV ainda não é clara (Pannone et al. 2011).

No presente estudo, somente casos de câncer de orofaringe mostraram infecções ativas pelo HPV, sugerindo uma limitada associação do HPV, tanto para o câncer da cavidade oral, quanto para o câncer de hipofaringe/ laringe. Adicionalmente, todos os casos de câncer de orofaringe com infecção ativa pelo HPV mostraram integração do DNA viral às células tumorais, em contrário ao reportado previamente (Mellin et al. 2002) cujos casos de câncer de tonsila HPV positivos apresentaram a forma episomal.

A prevalência de DNA do HPV aqui observada para os casos de câncer da cavidade oral (7,2%) foi similar à encontrada por um recente estudo com 409 pacientes (9,8%) que também reportou uma baixa atividade do HPV, presente em somente 5,9% dos casos (Lingen et al. 2012). Contrariamente aos achados do presente estudo, outros autores reportaram maiores prevalências do HPV em pacientes com câncer oral no Brasil (Acay et al. 2008; da Silva et al. 2007; Fregonesi et al. 2003; Kaminagakura et al. 2012; Lira et al. 2010; Mazon et al. 2011; Oliveira et al. 2009; Simonato et al. 2008; Soares et al. 2003; Soares et al. 2008; Soares et al. 2007), embora em nenhum desses estudos tenha sido analisado a atividade viral. A falta de associação do HPV no câncer da cavidade oral aqui reportada foi também previamente observada em dois outros estudos recentes no Brasil (Ribeiro et al. 2011; Spíndula-Filho et al. 2011).

Uma recente meta-análise de estudos caso-controle mostrou um risco bruto para o câncer oral 3,98 vezes maior para os indivíduos com infecção pelo HPV em comparação àqueles sem infecção (Syrjanen et al. 2011). No entanto, além dos autores não terem controlado o efeito do tabaco e do álcool, não houve acesso à localização anatômica detalhada dos casos de câncer oral, o que pode ter levado a erros de classificação. Um estudo realizado no México somente com casos de câncer oral reportou um risco 6,2 vezes maior para os casos HPV positivos (IC 95% = 2,98 - 12,97) em relação aos casos HPV negativos, mesmo ajustando pelo

consumo de tabaco e álcool (Anaya-Saavedra et al. 2008). Esses achados corroboram estudos anteriores que, no entanto, analisaram juntamente casos de câncer de orofaringe e câncer oral (Hansson et al. 2005; Smith et al. 1998). A análise de diferentes sítios anatômicos, sobretudo a inclusão de sítios de orofaringe, dificulta o entendimento da relação entre o HPV e o câncer da cavidade oral, assim como o reduzido número de estudos avaliando a atividade do HPV necessária para o processo de carcinogênese.

Em relação aos casos de câncer de hipofaringe/laringe, os dados do presente estudo são similares ao reportados recentemente por Ribeiro et al. (2011) que reportaram baixa prevalência do HPV nesse sítio anatômico e diferente de outros estudos no Brasil que reportaram maiores prevalências (Brito et al. 2000; de Oliveira et al. 2006; Hassumi-Fukasawa et al. 2012; Miranda et al. 2009; Silva et al. 2011). De acordo com uma recente avaliação de carcinogenicidade do HPV realizada pela IARC, as evidências de associação causal entre o HPV16 e o câncer de hipofaringe/ laringe são consideradas limitadas (Bouvard et al. 2009). O presente estudo suporta dados prévios de ausência de associação entre o HPV e o câncer de hipofaringe/ laringe observado por um estudo recente, no qual somente um dos 24 casos analisados foi positivo para infecção ativa pelo HPV (Hoffmann et al. 2012)

Em relação à prevalência do HPV nos casos de câncer de orofaringe aqui analisados (18,3%; 13/71), embora menor que em alguns estudos com diferentes metodologias de detecção viral (D'Souza et al. 2007; Smith et al. 2004), é consistente com outras estimativas observadas (Franceschi et al. 2000), e idêntica à encontrada por um estudo caso-controle multicêntrico realizado pela IARC em 9 países, distribuídos entre Europa, Ásia, Oceania, África e América Central e do Norte (Herrero et al. 2003). No entanto, essa prevalência foi maior em comparação aos dados de outro estudo da IARC com pacientes da América Latina (4,4%), incluindo indivíduos do Brasil e utilizando os mesmos iniciadores aqui empregados na primeira etapa das PCRs (Ribeiro et al. 2011). A diferença entre essas prevalências do HPV é, provavelmente, devido a maior sensibilidade na detecção do HPV pela metodologia de PCR-*nested* com os

iniciadores PGMY/GP+, utilizada neste estudo, em comparação à PCR utilizando os iniciadores PGMY, conforme previamente demonstrado (Fuessel Haws et al. 2004; Gravitt et al. 2000; Winder et al. 2009).

A atividade do HPV para os casos de câncer de orofaringe positivos por PCR no presente estudo foi de 53,9% (7/13), menor que a reportada por estudos anteriores variando de 85,7% (6/7; Smeets et al. 2007) a 100% (12/12; Hoffmann et al. 2012). Essa diferença é provavelmente devida, à maior sensibilidade de detecção do HPV pela metodologia aplicada no presente estudo em comparação a esses estudos prévios.

Os achados do presente estudo também mostram uma alta prevalência de HPV na região orofaríngea de indivíduos sem histórico de câncer (22,9%; 52/227) em relação a estudos analisando uma amostra maior de indivíduos controles e utilizando técnicas de PCR para detecção do HPV, nos quais a prevalência variou de 0,2% a 17,3% (2/1058 - (Ribeiro et al. 2011); 120/1732 - (Herrero et al. 2003); 43/248 - (Anaya-Saavedra et al. 2008); 67/1680 - (Kreimer et al. 2011)). A prevalência de HPV observada aqui para os controles foi também maior que a reportada por outros estudos no Brasil com menor número de indivíduos e diferentes metodologias de detecção do HPV (Cortezzi et al. 2004; do Sacramento et al. 2006). (Kreimer et al. 2011). No entanto, essa prevalência foi similar à encontrada no México (17,3%), inclusive dentre os casos positivos, cujas frequências de HPVs de alto-risco e baixo-risco foram, respectivamente 55,8% e 44,2% (Anaya-Saavedra et al. 2008). Embora esses estudos anteriores tenham sido realizados com critérios similares de elegibilidade para inclusão dos controles, os métodos de coleta das células superficiais foram específicos para a cavidade oral ou saliva dos indivíduos, não sendo amostrada a região da orofaringe, como analisado no presente estudo. No entanto, a prevalência aqui reportada foi também maior que um estudo analisando amostras de tecido de tonsila sem evidência de câncer, nas quais o HPV foi detectado em somente 1% (2/195) dos casos (Klingenberg et al. 2010), porém com diferentes metodologias para detecção e tipagem viral.

Algumas hipóteses para uma maior susceptibilidade da região orofaríngea em relação ao HPV quando comparada a outros sítios de cabeça e pescoço, são uma maior facilidade de infecção nesse tecido devido à invaginações da camada do epitélio (Frisch & Biggar 1999) e a presença de citocinas produzidas pelo tecido linfóide que podem estimular a transcrição viral e transformação celular (Franceschi et al. 2000). Adicionalmente, a complexa justaposição entre o epitélio escamoso celular e o tecido linfático das tonsilas possui propriedades similares às junções escamo-colunares do cérvix-uterino, onde ocorre a maioria dos cânceres HPV-associados, apesar da presença quase onipresente de infecção por HPV na vagina e vulva das mulheres sexualmente ativas (Winer et al. 2003).

Apesar da similaridade entre as prevalências de HPV, o presente estudo sugere fortemente que a distribuição dos tipos de HPV quanto ao potencial carcinogênico (alto ou baixo-risco) é diferenciada entre casos de câncer e controles de orofaringe ($p = 0,025$).

Embora estudos prévios tenham encontrado uma maior prevalência do HPV16 tanto para casos de câncer quanto para controles da cavidade oral e orofaringe (Smith et al. 2004), no presente estudo o HPV16 foi o tipo mais frequente entre os casos de câncer de orofaringe (69,2%; 9/13), similar aos dados de outros estudos (Gillison et al. 2000; Herrero et al. 2003; Schwartz et al. 1998; Smith et al. 1998), e o HPV6 o tipo mais frequente nos controles de orofaringe (44,2%; 23/52). A prevalência do HPV16 nos controles aqui analisados foi duas vezes maior (5,7%; 13/227) que a encontrada nos controles de um estudo de base hospitalar realizado nos EUA (2,8%; 17/604), no qual a coleta das células superficiais foi realizada a partir de saliva com células da região orofaríngea (Zhao et al. 2005). Apesar da alta sensibilidade da metodologia de PCR em tempo-real para detecção do HPV16 utilizada por estes últimos autores, é possível que essa diferença nas taxas de prevalências seja devido às distintas origens geográficas das amostras analisadas ou ainda pelo fato das células superficiais HPV positivas da orofaringe estarem diluídas na saliva.

Apesar dos dados da literatura sugerirem uma relação etiológica entre o HPV e o câncer de orofaringe baseadas na detecção e atividade do HPV, dados contrários acerca das relações entre o HPV e o câncer da cavidade oral e de hipofaringe/ laringe sugerem a necessidade de mais estudos, sobretudo com maior casuística, análise da atividade viral nesses sítios anatômicos, e utilização de metodologias com alta sensibilidade de detecção viral com amostragens representativas de diferentes regiões geográficas.

6.2. Fatores de risco para o câncer de cabeça e pescoço e de orofaringe

Em relação à exposição ao HPV, uma maior estimativa bruta de risco para o câncer de orofaringe foi verificada entre indivíduos HPV16 positivos em relação aos indivíduos HPV16 negativos, como observado em outros estudos que reportaram essa associação mesmo ajustada pelo efeito do sexo, idade, consumo de tabaco e álcool (D'Souza et al. 2007; Smith et al. 2004). Apesar dessa associação na análise ajustada não ter sido verificada no presente estudo, quando analisamos apenas os indivíduos nunca tabagistas ou nunca tabagistas e nunca etilistas um maior risco para o câncer de orofaringe foi observado entre indivíduos HPV16 positivos dentre aqueles em comparação aos indivíduos HPV16 negativos, confirmando outros estudos (Andrews et al. 2009; Gillison 2004; Gillison et al. 2000). Esses achados suportam a hipótese de que o efeito do HPV seja evidenciado no câncer de orofaringe na ausência de fatores de risco como tabagismo e o etilismo (Applebaum et al. 2007).

No presente estudo, a magnitude de associação para o câncer de orofaringe encontrada entre indivíduos HPV16 positivos, nunca tabagistas e nunca etilistas (RC 15,24; IC 95% = 2,36 - 98,58) foi 2,5 vezes maior que aquela encontrada em um estudo caso-controle nos EUA (RC 6,1, IC 95% = 1,3 - 28; Andrews et al. 2009) incluindo tumores da cavidade oral e orofaringe, dificultando assim a comparação dos dados. No entanto, a estimativa aqui encontrada foi menor em comparação a outro estudo nos EUA, no qual somente o sítio de orofaringe foi analisado (RC 43,7, IC 95% = 4,2 - 452,7), porém com uma maior proporção de indivíduos nunca tabagistas e nunca etilistas (D'Souza et al. 2007) que a analisada no presente estudo.

Uma alta estimativa de risco para o câncer de orofaringe também foi verificada para indivíduos com infecção pelo HPV16 e nunca tabagistas em comparação a indivíduos HPV16 negativos (RC 88,88; IC 95% = 5,66 - 1397,86), similar ao reportado para indivíduos com positividade para anticorpos E6 ou E7 do HPV16 e nunca tabagistas em comparação aqueles com sorologia negativa (RC 64,5; IC 95% = 18,3 - 226,7; (Herrero et al. 2003), ainda que esses

resultados possam representar infecções atuais ou prévias em qualquer sítio de lesão HPV relacionada.

A maior proporção de indivíduos com HPV na orofaringe observada naqueles com mais de dois parceiros sexuais e prática de sexo oral em comparação àqueles com menos de dois parceiros sexuais e sem prática de sexo oral ($p = 0,004$) sugere que a transmissão sexual do HPV pela via genital-oral seja a principal via de infecção, corroborando com evidências prévias (Herrero et al. 2003). No entanto, é possível que outras vias de transmissão, como o contato digital- genital (Burchell et al. 2006) possam explicar a infecção pelo HPV nos casos de orofaringe em indivíduos sem prática de sexo oral analisados neste estudo. Apesar dessa relação encontrada entre um maior número de parceiros e prática de sexo oral e presença do HPV, não foi verificado no presente estudo um aumento de risco para câncer de cabeça e pescoço ou orofaringe em indivíduos com maior número de parceiros ou prática de sexo oral, contrariamente ao encontrado em alguns estudos anteriores (D'Souza et al. 2007; Kreimer et al. 2004; Rosenquist et al. 2005; Schwartz et al. 1998). Conforme a hipótese de que o efeito do HPV é evidenciado no câncer de orofaringe na ausência de fatores de risco como tabagismo e o etilismo, é possível que essas associações previamente reportadas tenham sido observadas por uma maior proporção de indivíduos nunca tabagistas e nunca etilistas em comparação ao presente estudo.

O maior risco para câncer de cabeça e pescoço verificado entre os indivíduos com orientação homossexual ou bissexual neste estudo, pode estar relacionado ao fato de que este grupo de indivíduos apresenta um consumo mais frequente de álcool, quando comparados aos indivíduos heterossexuais (Greenwood et al. 2001).

Alguns autores tem observado um sinergismo entre a detecção do HPV e o consumo de álcool nos casos de câncer de cabeça e pescoço (Smith et al. 2004), sugerindo que o álcool possa biologicamente modificar o tecido da mucosa oral, aumentando potencialmente a possibilidade de infecção pelo HPV (Molina et al. 2002). No entanto, esse sinergismo não foi

verificado no presente estudo, em concordância com outros autores (Schwartz et al. 1998). Estudos da reposta imune local em pacientes com câncer de cabeça e pescoço podem esclarecer o possível sinergismo entre a infecção pelo HPV em pacientes com alto consumo de álcool.

A magnitude de associação observada nesse estudo para o câncer de orofaringe em indivíduos ex ou atuais tabagistas em comparação aqueles nunca tabagistas (RC 6,04; IC 95% = 1,64 - 22,30), independente do efeito do álcool, foi similar às estimativas de risco prévias, variando de 4 a 6 (IARC 2004; Lee et al. 2009), apesar da heterogeneidade da origem geográfica da população analisada. O risco para o câncer de cabeça e pescoço aqui reportado para indivíduos tabagistas em comparação aqueles nunca tabagistas (9,91; IC 95% = 1,05 - 4,87) é similar a estimativa para câncer de laringe reportada por Vineis *et al.* (2004) e maior que a estimativa aqui observada para o câncer de orofaringe. Esse aumento de risco pode ser devido à proporção de casos de câncer de laringe analisado dentre os casos de câncer de cabeça e pescoço, visto que esta é região mais susceptível aos efeitos do tabagismo (Hashibe et al. 2007). Esses dados confirmam que o tabagismo é um forte fator de risco para o câncer de cabeça e pescoço e de orofaringe como encontrado por outros estudos (Blot et al. 1988; Garrote et al. 2001; Hashibe et al. 2007; IARC 2004). A variação do efeito desses fatores de risco de acordo com o sítio do tumor analisado também foi encontrada em estudos prévios (Lee et al. 2009; Vineis et al. 2004).

No presente estudo, tanto para o câncer de cabeça e pescoço, quanto para o câncer de orofaringe a associação em relação ao etilismo foi verificada somente para indivíduos com alto consumo de álcool, corroborando achados de outros autores (Hashibe et al. 2007). Adicionalmente, o presente estudo suporta um sinergismo entre tabagismo e o alto consumo de álcool no câncer de orofaringe verificado por um risco 2,3 vezes maior entre indivíduos ex ou atuais tabagistas e com consumo de álcool acima de 21 gramas de etanol/dia (RC 13,82; IC 95% = 1,71 - 111,43) em comparação aos indivíduos ex ou atual tabagista sem controlar o efeito

do álcool (RC 6,04; IC 95% = 1,64 - 22,30). Esse sinergismo foi reportado previamente, ainda que em diferentes magnitudes de associação (Blot et al. 1988; Iribarren et al. 1999).

Os dados do presente estudo mostraram associação entre a escassez de cuidado oral e o risco para o câncer de orofaringe entre indivíduos com número de escovação dentária menor que uma vez ao dia, independente do consumo de tabaco e álcool, corroborando achados prévios (Guha et al. 2007). A escassez de cuidado oral pode levar ao desenvolvimento de doença periodontal e uma resposta inflamatória antibacteriana reconhecida por desempenhar um papel no desenvolvimento de câncer (Karin et al. 2006). No entanto, a falta de cuidado oral não foi associada ao câncer de cabeça e pescoço no presente estudo, assim como publicado anteriormente em uma análise combinada de tumores da cavidade oral, faringe e laringe (Guha et al. 2007), provavelmente devido a menor relação biológica dos cuidados orais sobretudo para o câncer de hipofaringe/ laringe. Adicionalmente, o risco para câncer de orofaringe foi reduzido para os indivíduos que realizaram consulta odontológica, assim como verificado anteriormente (Guha et al. 2007). O nível educacional tem sido utilizado para mensurar o status socioeconômico de populações (Guha et al. 2007). No entanto, poucos estudos foram realizados acerca do efeito dos fatores socioeconômicos ajustado por demais fatores de risco ambientais associados aos tumores do trato aero digestivo (Conway et al. 2010). O status socioeconômico foi um fator de risco para tumores do trato aero digestivo, independente do consumo de tabaco e álcool em estudos prévios (Elwood et al. 1984; Ferraroni et al. 1989). No entanto, estudos mais recentes mostram a ausência de associação entre os efeitos socioeconômicos e o câncer de cabeça e pescoço quando ajustado por consumo de tabaco e álcool (Conway et al. 2010; Greenberg et al. 1991). No presente estudo, uma relação direta foi observada entre um maior risco para o câncer de cabeça e pescoço e de orofaringe em indivíduos com menor grau de instrução, independente do consumo de tabaco e álcool. Entretanto, esses dados devem ser analisados com cautela devido o reduzido número de indivíduos com câncer de orofaringe aqui avaliados que pode ter comprometido a análise multivariada. A falta de clareza dessa avaliação

não exclui a associação dos fatores de risco socioeconômicos à natureza complexa do câncer de cabeça e pescoço, porém estudos mais detalhados e com maior número de casos são necessários para o entendimento dessas relações.

6.3. Superexpressão de p16INK4a como um marcador de atividade do HPV

A superexpressão de p16INK4a tem sido sugerida como um marcador de atividade pelo HPV nos casos de câncer de cabeça e pescoço (Hoffmann *et al.* 2012; Singhi & Westra 2010; Smeets *et al.* 2007), dado a hipótese de um mecanismo de regulação negativa, no qual a proteína viral E7 se liga à inibidores de ciclinas dependentes de quinases, como a proteína CDKN2A, levando à um aumento do nível de pRb fosforilada, a qual permite a progressão do ciclo celular (Jones *et al.* 1997). No entanto, um estudo recente mostrou que a superexpressão de p16INK4a mediada pela proteína E7 do HPV16 é independente da inativação de pRb e regulada por KDM6B, uma histona desacetilase, por uma via de reprogramação epigenética das células hospedeiras (McLaughlin-Drubin *et al.* 2011). Essa hipótese recente suporta achados de casos de câncer de cabeça e pescoço com atividade pelo HPV e negativos para p16INK4a (Hoffmann *et al.* 2012), questionando a utilização deste marcador como substituto para detecção do HPV no câncer de cabeça e pescoço.

No presente estudo, apesar de um alto valor preditivo negativo observado para todas as comparações entre a detecção do HPV por PCR e p16INK4a nos diferentes sítios anatômicos de câncer de cabeça e pescoço, somente para os casos de câncer de orofaringe (sendo todos com infecções ativas pelo HPV) foi possível observar um alto valor preditivo positivo (82%), corroborando dados prévios da utilização desse marcador para identificação de infecções ativas pelo HPV em casos de câncer de orofaringe quando a detecção do HPV por PCR não é possível ser realizada (Klingenberg *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2008; Licitra *et al.* 2006; Smith *et al.* 2008). Além disso, o critério aqui utilizado para positividade de p16INK4a (baseado na marcação forte ou difusa de mais que 70% das células tumorais) mostrou ainda um menor número de casos falsos positivos em relação a estudos prévios (Hoffmann *et al.* 2012; Smeets *et al.* 2007).

Apesar de alguns estudos mostrarem que pacientes com câncer de orofaringe e superexpressão de p16INK4a e/ou presença do HPV apresentam melhor sobrevida em comparação aqueles negativos (Ang *et al.* 2010; Lassen *et al.* 2009; Sedaghat *et al.* 2009), outros

estudos reportam não haver diferença no prognóstico de pacientes submetidos à diferentes protocolos de tratamentos em ensaios clínicos randomizados baseado no status de p16INK4a e/ou HPV (Ang et al. 2010; Lassen et al. 2009; Smeets et al. 2007), sugerindo que esses status não sejam suficientes para selecionar grupos de pacientes com melhor prognóstico. Portanto, baseado nos dados atualmente disponíveis, um tratamento menos agressivo para os casos com superexpressão de p16INK4a ainda não é justificado (Langendijk & Psyrri 2010). Estudos futuros sobre a contribuição do HPV e a utilização do marcador p16INK4a como indicador de atividade viral nos distintos sítios anatômicos dos tumores de cabeça e pescoço considerando também a exposição aos fatores de risco bem estabelecidos, como tabaco e álcool, são necessários a fim de identificar grupos de pacientes que possam ser beneficiados com diferentes protocolos de tratamento.

Um estudo sobre a utilização de p16INK4a como um marcador de atividade do HPV em casos de câncer de orofaringe foi realizado em colaboração com a equipe do Dr. Gerald Niedobitek analisando pacientes atendidos no Instituto de Patologia UKB, Berlim na Alemanha (em preparação). Os resultados desse estudo prévio suportaram a definição dos critérios utilizados nas análises de p16INK4a do presente estudo.

7. Conclusões

Este estudo mostra uma distinta relação etiológica do HPV nos diferentes sítios de câncer de cabeça e pescoço, sugerindo um papel etiológico do HPV no câncer de orofaringe e a limitada relação nos tumores da cavidade oral e hipofaringe/ laringe. Essa hipótese é sustentada, principalmente, pela presença de atividade das oncoproteínas virais E6 e E7 somente para casos de câncer de orofaringe.

A prevalência do HPV na orofaringe de indivíduos saudáveis e nos casos de câncer de cabeça e pescoço foi similar, porém com uma distribuição distinta dos tipos de HPV quanto ao potencial carcinogênico. O grupo controle apresentou elevada prevalência de HPV de baixo-risco, enquanto os casos de câncer de orofaringe foram relacionados à infecção por HPV de alto-risco. O tipo mais frequente nos controles foi o HPV6, enquanto nos casos de câncer foi o HPV16.

Esse estudo caso-controle confirmou ainda a associação de fatores de risco previamente estabelecidos para o câncer de cabeça e pescoço como tabaco e álcool, e outros anteriormente sugeridos como o status socio-econômico e cuidados bucais.

Um maior risco para o câncer de orofaringe entre indivíduos HPV positivos nunca tabagistas e/ou nunca tabagistas e nunca etilistas corrobora a hipótese de duas diferentes vias na carcinogênese de orofaringe, uma desencadeada por fatores ambientais, como o consumo de tabaco e álcool e outra direcionada pelo HPV, cujo efeito seja evidenciado na ausência desses fatores de risco. Estudos epidemiológicos adicionais com maior número de indivíduos com câncer de cabeça e pescoço sem exposição ao tabaco e álcool são indicados para a confirmação desses dados.

A utilização de p16INK4a como marcador para identificação de infecção ativa pelo HPV no câncer de orofaringe foi suportada por esse estudo, ainda que com cautela para

diferentes abordagens terapêuticas devido à presença de casos falso-positivos. A aplicação desse marcador não é, portanto indicada para os demais sítios anatômicos de cabeça e pescoço.

8. Referências bibliográficas

- Acay R, Rezende N, Fontes A, Aburad A, Nunes F, Sousa S 2008. Human papillomavirus as a risk factor in oral carcinogenesis: a study using in situ hybridization with signal amplification. *Oral Microbiol Immunol*, 23, 271-274.
- Alsner J, Sorensen SB, Overgaard J 2001. TP53 mutation is related to poor prognosis after radiotherapy, but not surgery, in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Radiother Oncol*, 59, 179-185.
- Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Garcia-Cuellar CM, Guido-Jimenez M, Mendez-Martinez R, Garcia-Carranca A 2008. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Arch Med Res*, 39, 189-197.
- Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, Klein W, Helbig M, Dietz A, Weidauer H, Bosch FX 1998. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Res*, 58, 5-13.
- Andrews E, Seaman WT, Webster-Cyriaque J 2009. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral Oncol*, 45, 486-491.
- Androphy EJ, Lowy DR, Schiller JT 1987. Bovine papillomavirus E2 trans-activating gene product binds to specific sites in papillomavirus DNA. *Nature*, 325, 70-73.
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML 2010. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 363, 24-35.
- Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, Eisen EA, Peters ES, McClean MD, Kelsey KT 2007. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*, 99, 1801-1810.

- Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK 2011. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer*, 129, 733-741.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr. 1988. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res*, 48, 3282-3287.
- Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV 2002. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 55, 244-265.
- Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Freeman C, Galichet L, Coglianò V 2009. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*, 10, 321-322.
- Bouvard V, Matlashewski G, Gu ZM, Storey A, Banks L 1994. The human papillomavirus type 16 E5 gene cooperates with the E7 gene to stimulate proliferation of primary cells and increases viral gene expression. *Virology*, 203, 73-80.
- Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Meijer CJ, Snijders PJ, Leemans CR 2009. Human papilloma virus in head and neck cancer: the need for a standardised assay to assess the full clinical importance. *Eur J Cancer*, 45, 2935-2939.
- Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH 2004. Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *J Natl Cancer Inst*, 96, 998-1006.
- Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J 2012. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*.
- Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, Couch MJ, Forastiere AA, Sidransky D 1995. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 332, 712-717.

- Brito H, Vassallo J, Altemani A 2000. Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous dysplasia and carcinoma. An in situ hybridization and signal amplification study. *Acta Otolaryngol*, 120, 540-544.
- Buck CB, Thompson CD, Pang YY, Lowy DR, Schiller JT 2005. Maturation of papillomavirus capsids. *J Virol*, 79, 2839-2846.
- Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, Franco EL 2006. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*, 24 Suppl 3, S3/52-61.
- Butz K, Hoppe-Seyler F 1993. Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. *J Virol*, 67, 6476-6486.
- Cabelguenne A, Lorient MA, Stucker I, Blons H, Koum-Besson E, Brasnu D, Beaune P, Laccourreye O, Laurent-Puig P, De Waziers I 2001. Glutathione-associated enzymes in head and neck squamous cell carcinoma and response to cisplatin-based neoadjuvant chemotherapy. *Int J Cancer*, 93, 725-730.
- Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, Di Liberto C, Scully C, Lo Muzio L 2007. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol*, 30, 813-823.
- Carson KF, Wen DR, Li PX, Lana AM, Bailly C, Morton DL, Cochran AJ 1996. Nodal nevi and cutaneous melanomas. *Am J Surg Pathol*, 20, 834-840.
- Castro TP, Bussoloti Filho I 2006. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol*, 72, 272-282.
- Charfi L, Jouffroy T, de Cremoux P, Le Peltier N, Thioux M, Freneaux P, Point D, Girod A, Rodriguez J, Sastre-Garau X 2008. Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome. *Cancer Lett*, 260, 72-78.

- Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R 2009. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head Neck Oncol*, 1, 22.
- Cheng S, Schmidt-Grimminger DC, Murrant T, Broker TR, Chow LT 1995. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular DNA replication in suprabasal differentiated keratinocytes. *Genes Dev*, 9, 2335-2349.
- Conger KL, Liu JS, Kuo SR, Chow LT, Wang TS 1999. Human papillomavirus DNA replication. Interactions between the viral E1 protein and two subunits of human dna polymerase alpha/primase. *J Biol Chem*, 274, 2696-2705.
- Conway DI, McMahon AD, Smith K, Black R, Robertson G, Devine J, McKinney PA 2010. Components of socioeconomic risk associated with head and neck cancer: a population-based case-control study in Scotland. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 48, 11-17.
- Cortezzi SS, Provazzi PJ, Sobrinho JS, Mann-Prado JC, Reis PM, de Freitas SE, Filho JF, Fukuyama EE, Cordeiro JA, Cury PM, Maniglia JV, Villa LL, Tajara EH, Rahal P 2004. Analysis of human papillomavirus prevalence and TP53 polymorphism in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*, 150, 44-49.
- Crawford LV 1969. Nucleic acids of tumor viruses. *Adv Virus Res*, 14, 89-152.
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML 2007. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 356, 1944-1956.
- da Silva CE, da Silva ID, Cerri A, Weckx LL 2007. Prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 104, 497-500.
- Day PM, Lowy DR, Schiller JT 2003. Papillomaviruses infect cells via a clathrin-dependent pathway. *Virology*, 307, 1-11.

- de Oliveira DE, Bacchi MM, Macareno RS, Tagliarini JV, Cordeiro RC, Bacchi CE 2006. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 126, 284-293.
- de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ 1995. The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol*, 76 (Pt 4), 1057-1062.
- de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H 2004. Classification of papillomaviruses. *Virology*, 324, 17-27.
- Deschler DG, Day T 2008. Pocket guide to neck dissection classification and TNM staging of head and neck cancer.
- do Sacramento PR, Babeto E, Colombo J, Cabral Ruback MJ, Bonilha JL, Fernandes AM, Pereira Sobrinho JS, de Souza FP, Villa LL, Rahal P 2006. The prevalence of human papillomavirus in the oropharynx in healthy individuals in a Brazilian population. *J Med Virol*, 78, 614-618.
- Doorbar J 2006. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci (Lond)*, 110, 525-541.
- Doorbar J, Ely S, Sterling J, McLean C, Crawford L 1991. Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network. *Nature*, 352, 824-827.
- Duensing S, Munger K 2001. Centrosome abnormalities, genomic instability and carcinogenic progression. *Biochim Biophys Acta*, 1471, M81-88.
- Duensing S, Munger K 2002. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability. *Cancer Res*, 62, 7075-7082.

- Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 243, 934-937.
- Elwood JM, Pearson JC, Skippen DH, Jackson SM 1984. Alcohol, smoking, social and occupational factors in the aetiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *Int J Cancer*, 34, 603-612.
- Favre M, Orth G, Croissant O, Yaniv M 1975. Human papillomavirus DNA: physical map. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72, 4810-4814.
- Fehrmann F, Laimins LA 2003. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. *Oncogene*, 22, 5201-5207.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM 2010. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, Version 1.0. *Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.*
- Ferraroni M, Negri E, La Vecchia C, D'Avanzo B, Franceschi S 1989. Socioeconomic indicators, tobacco and alcohol in the aetiology of digestive tract neoplasms. *Int J Epidemiol*, 18, 556-562.
- Franceschi S, Munoz N, Bosch XF, Snijders PJ, Walboomers JM 1996. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 5, 567-575.
- Franceschi S, Munoz N, Snijders PJ 2000. How strong and how wide is the link between HPV and oropharyngeal cancer? *Lancet*, 356, 871-872.
- Fregonesi PA, Teresa DB, Duarte RA, Neto CB, de Oliveira MR, Soares CP 2003. p16(INK4A) immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem*, 51, 1291-1297.
- Frisch M, Biggar RJ 1999. Aetiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet*, 354, 1442-1443.

- Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, Stisser K, Konig R, Tyring SK 2004. Nested PCR with the PGMY09/11 and GP5(+)/6(+) primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods*, 122, 87-93.
- Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Nelson HH, Peters ES, Posner MR, Clark JR, Eisen EA, Kelsey KT 2007. Human papillomavirus 16 and head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 120, 2386-2392.
- Garrote LF, Herrero R, Reyes RM, Vaccarella S, Anta JL, Ferbeye L, Munoz N, Franceschi S 2001. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer*, 85, 46-54.
- Gillison ML 2004. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Semin Oncol*, 31, 744-754.
- Gillison ML 2006. Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. *J Clin Oncol*, 24, 5623-5625.
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D 2000. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 92, 709-720.
- Gillison ML, Lowy DR 2004. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet*, 363, 1488-1489.
- Gillison ML, Shah KV 2001. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol*, 13, 183-188.
- Girianelli VR, Azevedo ESG, Thuler LC 2009. Factors associated with the risk of progression to precursor lesions or cervical cancer in women with negative cytologic findings. *Int J Gynaecol Obstet*, 107, 228-231.

- Girianelli VR, Santos Thuler LC 2007. Evaluation of agreement between conventional and liquid-based cytology in cervical cancer early detection based on analysis of 2,091 smears: experience at the Brazilian National Cancer Institute. *Diagn Cytopathol*, 35, 545-549.
- Girianelli VR, Thuler LC, Szklo M, Donato A, Zardo LM, Lozana JA, Almeida Neto OF, Carvalho AC, Matos JH, Figueiredo V 2006. Comparison of human papillomavirus DNA tests, liquid-based cytology and conventional cytology for the early detection of cervix uteri cancer. *Eur J Cancer Prev*, 15, 504-510.
- Giroglou T, Florin L, Schafer F, Streeck RE, Sapp M 2001. Human papillomavirus infection requires cell surface heparan sulfate. *J Virol*, 75, 1565-1570.
- Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, Wheeler CM, Coutlee F, Hildesheim A, Schiffman MH, Scott DR, Apple RJ 2000. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, 38, 357-361.
- Greenberg RS, Haber MJ, Clark WS, Brockman JE, Liff JM, Schoenberg JB, Austin DF, Preston-Martin S, Stemhagen A, Winn DM, et al. 1991. The relation of socioeconomic status to oral and pharyngeal cancer. *Epidemiology*, 2, 194-200.
- Greenwood GL, White EW, Page-Shafer K, Bein E, Osmond DH, Paul J, Stall RD 2001. Correlates of heavy substance use among young gay and bisexual men: The San Francisco Young Men's Health Study. *Drug Alcohol Depend*, 61, 105-112.
- Guha N, Boffetta P, Wunsch Filho V, Eluf Neto J, Shangina O, Zaridze D, Curado MP, Koifman S, Matos E, Menezes A, Szeszenia-Dabrowska N, Fernandez L, Mates D, Daudt AW, Lissowska J, Dikshit R, Brennan P 2007. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol*, 166, 1159-1173.
- Hafkamp HC, Manni JJ, Speel EJ 2004. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. *Acta Otolaryngol*, 124, 520-526.

- Hafkamp HC, Mooren JJ, Claessen SM, Klingenberg B, Voogd AC, Bot FJ, Klussmann JP, Hopman AH, Manni JJ, Kremer B, Ramaekers FC, Speel EJ 2009. P21 Cip1/WAF1 expression is strongly associated with HPV-positive tonsillar carcinoma and a favorable prognosis. *Mod Pathol*, 22, 686-698.
- Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Andersson G 2005. Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol*, 125, 1337-1344.
- Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wunsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P 2007. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst*, 99, 777-789.
- Hassumi-Fukasawa MK, Miranda-Camargo FA, Guimaraes MC, Simoes RT, Donadi EA, Soares CP, Soares EG 2012. Possible implication of Mdm2 as a prognostic marker in invasive laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 269, 1795-1804.
- Hawley-Nelson P, Androphy EJ, Lowy DR, Schiller JT 1988. The specific DNA recognition sequence of the bovine papillomavirus E2 protein is an E2-dependent enhancer. *EMBO J*, 7, 525-531.
- Hennessey PT, Westra WH, Califano JA 2009. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. *J Dent Res*, 88, 300-306.

- Herrero R 2003. Chapter 7: Human papillomavirus and cancer of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst Monogr*, 47-51.
- Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, Rajkumar T, Sridhar H, Rose B, Pintos J, Fernandez L, Idris A, Sanchez MJ, Nieto A, Talamini R, Tavani A, Bosch FX, Reidel U, Snijders PJ, Meijer CJ, Viscidi R, Munoz N, Franceschi S 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 95, 1772-1783.
- Hobbs CG, Sterne JA, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ 2006. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol*, 31, 259-266.
- Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, Henry H, Pfannenschmidt S, Burkhardt C, Gorogh T, Halec G, Hoffmann AS, Kahn T, Rocken C, Haag J, Waterboer T, Schmitt M 2012. HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer Lett*, 323, 88-96.
- Holzinger D, Halec G, Schmitt M, Pawlita M, Bosch FX 2009. O199. Molecular characterization of HPV16-associated squamous cell carcinomas of the oropharynx and larynx. *Oral Oncology Supplement*, 3, 122.
- Hughes FJ, Romanos MA 1993. E1 protein of human papillomavirus is a DNA helicase/ATPase. *Nucleic Acids Res*, 21, 5817-5823.
- Hummel M, Hudson JB, Laimins LA 1992. Differentiation-induced and constitutive transcription of human papillomavirus type 31b in cell lines containing viral episomes. *J Virol*, 66, 6070-6080.
- IARC 1980. Statistic methods in cancer research Volume 1. The analysis of case-control studies.
- IARC 2004. Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 83, 1-1438.

- Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–105 [homepage on the Internet], Lion, França: 2012. Available from: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>.
- INCA 2012. Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil.
- Iribarren C, Tekawa IS, Sidney S, Friedman GD 1999. Effect of cigar smoking on the risk of cardiovascular disease, chronic obstructive pulmonary disease, and cancer in men. *N Engl J Med*, 340, 1773-1780.
- Jo S, Juhasz A, Zhang K, Ruel C, Loera S, Wilczynski SP, Yen Y, Liu X, Ellenhorn J, Lim D, Paz B, Somlo G, Vora N, Shibata S 2009. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in oropharyngeal squamous cell carcinomas treated in a prospective phase II clinical trial. *Anticancer Res*, 29, 1467-1474.
- Jones DL, Thompson DA, Munger K 1997. Destabilization of the RB tumor suppressor protein and stabilization of p53 contribute to HPV type 16 E7-induced apoptosis. *Virology*, 239, 97-107.
- Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, Nishimoto IN, Rocha R, Kowalski LP 2012. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int J Cancer*, 130, 1726-1732.
- Karin M, Lawrence T, Nizet V 2006. Innate immunity gone awry: linking microbial infections to chronic inflammation and cancer. *Cell*, 124, 823-835.
- Klingenberg B, Hafkamp HC, Haesevoets A, Manni JJ, Slootweg PJ, Weissenborn SJ, Klussmann JP, Speel EJ 2010. p16 INK4A overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV. *Histopathology*, 56, 957-967.
- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Eckel HE, Pfister HJ, Fuchs PG 2003. Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol*, 192, 129-132.

- Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, Dries V, Kolligs J, Jungehuelsing M, Eckel HE, Dienes HP, Pfister HJ, Fuchs PG 2001. Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer*, 92, 2875-2884.
- Ko Y, Abel J, Harth V, Brode P, Antony C, Donat S, Fischer HP, Ortiz-Pallardo ME, Thier R, Sachinidis A, Vetter H, Bolt HM, Herberhold C, Bruning T 2001. Association of CYP1B1 codon 432 mutant allele in head and neck squamous cell cancer is reflected by somatic mutations of p53 in tumor tissue. *Cancer Res*, 61, 4398-4404.
- Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D 1999. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope*, 109, 1544-1551.
- Kong CS, Balzer BL, Troxell ML, Patterson BK, Longacre TA 2007. p16INK4A immunohistochemistry is superior to HPV in situ hybridization for the detection of high-risk HPV in atypical squamous metaplasia. *Am J Surg Pathol*, 31, 33-43.
- Kreimer AR, Alberg AJ, Viscidi R, Gillison ML 2004. Gender differences in sexual biomarkers and behaviors associated with human papillomavirus-16, -18, and -33 seroprevalence. *Sex Transm Dis*, 31, 247-256.
- Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S 2005. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, 467-475.
- Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, Hildesheim A, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Giuliano AR 2011. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20, 172-182.
- Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, Wolf GT, Urba SG, Chepeha DB, Teknos TN, Eisbruch A, Tsien CI, Taylor JM, D'Silva NJ, Yang K, Kurnit DM, Bauer JA, Bradford CR, Carey TE 2008. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex,

- and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol*, 26, 3128-3137.
- Kurvinen K, Yliskoski M, Saarikoski S, Syrjanen K, Syrjanen S 2000. Variants of the long control region of human papillomavirus type 16. *Eur J Cancer*, 36, 1402-1410.
- Langendijk JA, Psyrri A 2010. The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Ann Oncol*, 21, 1931-1934.
- Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J 2009. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*, 27, 1992-1998.
- Lechner MS, Mack DH, Finicle AB, Crook T, Vousden KH, Laimins LA 1992. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J*, 11, 3045-3052.
- Lee YC, Marron M, Benhamou S, Bouchardy C, Ahrens W, Pohlman H, Lagiou P, Trichopoulos D, Agudo A, Castellsague X, Bencko V, Holcatova I, Kjaerheim K, Merletti F, Richiardi L, Macfarlane GJ, Macfarlane TV, Talamini R, Barzan L, Canova C, Simonato L, Conway DI, McKinney PA, Lowry RJ, Sneddon L, Znaor A, Healy CM, McCartan BE, Brennan P, Hashibe M 2009. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 3353-3361.
- Li W, Thompson CH, Cossart YE, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Rose BR 2004. The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Head Neck*, 26, 1-9.
- Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantu G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, Bergamini C, Olmi P, Pierotti MA, Pilotti S 2006.

- High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 24, 5630-5636.
- Lingen MW, Xiao W, Schmidt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, Perez-Ordóñez B, Jordan RC, Gillison ML 2012. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*.
- Lira RC, Miranda FA, Guimaraes MC, Simoes RT, Donadi EA, Soares CP, Soares EG 2010. BUBR1 expression in benign oral lesions and squamous cell carcinomas: correlation with human papillomavirus. *Oncol Rep*, 23, 1027-1036.
- Marklund L, Hammarstedt L 2011. Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol*, 2011, 509036.
- Mazon CR, Gerbelli RT, Neto BC, de Oliveira MR, Donaldi AE, Goncalves GMA, Soares GE, Klay PC, Tersariol I, Pinhal A, M., Resende L, Soares PC 2011. Abnormal cell-cycle expression of the proteins p27, mdm2 and cathepsin B in oral squamous-cell carcinoma infected with human papillomavirus. *Acta Histochem*, 113, 109-116.
- McLaughlin-Drubin ME, Crum CP, Munger K 2011. Human papillomavirus E7 oncoprotein induces KDM6A and KDM6B histone demethylase expression and causes epigenetic reprogramming. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108, 2130-2135.
- Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, Dalianis T 2002. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer*, 102, 152-158.
- Mietz JA, Unger T, Huibregtse JM, Howley PM 1992. The transcriptional transactivation function of wild-type p53 is inhibited by SV40 large T-antigen and by HPV-16 E6 oncoprotein. *EMBO J*, 11, 5013-5020.
- Miller CS, Zeuss MS, White DK 1994. Detection of HPV DNA in oral carcinoma using polymerase chain reaction together with in situ hybridization. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 77, 480-486.

- Miranda FA, Hassumi MK, Guimaraes MC, Simoes RT, Silva TG, Lira RC, Rocha AM, Mendes CT, Jr., Donadi EA, Soares CP, Soares EG 2009. Galectin-3 overexpression in invasive laryngeal carcinoma, assessed by computer-assisted analysis. *J Histochem Cytochem*, 57, 665-673.
- Molina PE, McClain C, Valla D, Guidot D, Diehl AM, Lang CH, Neuman M 2002. Molecular pathology and clinical aspects of alcohol-induced tissue injury. *Alcohol Clin Exp Res*, 26, 120-128.
- Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Moller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J 2001. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*, 344, 1125-1131.
- Mulvany NJ, Allen DG, Wilson SM 2008. Diagnostic utility of p16INK4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies. *Pathology*, 40, 335-344.
- Munger K, Phelps WC, Bubb V, Howley PM, Schlegel R 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J Virol*, 63, 4417-4421.
- Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ 2003. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 348, 518-527.
- Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, Ahrlund-Richter S, Marklund L, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Lindholm J, Sparen P, Ye W, Dahlstrand H, Munck-Wikland E, Dalianis T 2009. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*, 125, 362-366.
- Negri E, La Vecchia C, Franceschi S, Tavani A 1993. Attributable risk for oral cancer in northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2, 189-193.

- Oliveira MC, Soares RC, Pinto LP, Souza LB, Medeiros SR, Costa Ade L 2009. High-risk human papillomavirus (HPV) is not associated with p53 and bcl-2 expression in oral squamous cell carcinomas. *Auris Nasus Larynx*, 36, 450-456.
- Pannone G, Santoro A, Papagerakis S, Lo Muzio L, De Rosa G, Bufo P 2011. The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. *Infect Agent Cancer*, 6, 4.
- Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, Herrero R, Coutlee F, Franco EL 2008. Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol*, 44, 242-250.
- Ragin CC, Taioli E 2007. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 121, 1813-1820.
- Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A 2009. E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *J Natl Cancer Inst*, 101, 412-423.
- Rezende CP, Ramos MB, Daguila CH, Dedivitis RA, Rapoport A 2008. Oral health changes in with oral and oropharyngeal cancer. *Braz J Otorhinolaryngol*, 74, 596-600.
- Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V, Curado MP, Shangina O, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Daudt A, Menezes A, Bencko V, Mates D, Fernandez L, Fabianova E, Gheit T, Tommasino M, Boffetta P, Brennan P, Waterboer T 2011. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol*, 40, 489-502.
- Romanczuk H, Howley PM 1992. Disruption of either the E1 or the E2 regulatory gene of human papillomavirus type 16 increases viral immortalization capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 3159-3163.

- Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladstrom A, Goran Hansson B, Andersson G 2005. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol*, 125, 1327-1336.
- Sanchez MJ, Martinez C, Nieto A, Castellsague X, Quintana MJ, Bosch FX, Munoz N, Herrero R, Franceschi S 2003. Oral and oropharyngeal cancer in Spain: influence of dietary patterns. *Eur J Cancer Prev*, 12, 49-56.
- Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK, Galloway DA 1998. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*, 90, 1626-1636.
- Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, Palermo R, Best S, Ulmer KM, Levine M, Zinreich E, Messing BP, Gold D, Wu AA, Niparko KJ, Kowalski J, Hirata RM, Saunders JR, Westra WH, Pai SI 2009. Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*, 119, 1542-1549.
- Shi W, Kato H, Perez-Ordenez B, Pintilie M, Huang S, Hui A, O'Sullivan B, Waldron J, Cummings B, Kim J, Ringash J, Dawson LA, Gullane P, Siu L, Gillison M, Liu FF 2009. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *J Clin Oncol*, 27, 6213-6221.
- Silva TG, Crispim JC, Miranda FA, Hassumi MK, de Mello JM, Simoes RT, Souto F, Soares EG, Donadi EA, Soares CP 2011. Expression of the nonclassical HLA-G and HLA-E molecules in laryngeal lesions as biomarkers of tumor invasiveness. *Histol Histopathol*, 26, 1487-1497.
- Simonato LE, Garcia JF, Sundefeld ML, Mattar NJ, Veronese LA, Miyahara GI 2008. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. *J Oral Pathol Med*, 37, 593-598.

- Singhi AD, Westra WH 2010. 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*, 116, 2166-2173.
- Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH 2007. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*, 121, 2465-2472.
- Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH 1998. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope*, 108, 1098-1103.
- Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, Turek LP 2004. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*, 96, 449-455.
- Smith EM, Wang D, Kim Y, Rubenstein LM, Lee JH, Haugen TH, Turek LP 2008. P16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol*, 44, 133-142.
- Soares CP, Benatti Neto C, Fregonezi PA, Teresa DB, Santos RT, Longatto Filho A, Maeda MY 2003. Computer-assisted analysis of p53 and PCNA expression in oral lesions infected with human papillomavirus. *Anal Quant Cytol Histol*, 25, 19-24.
- Soares RC, Oliveira MC, de Souza LB, Costa Ade L, Pinto LP 2008. Detection of HPV DNA and immunohistochemical expression of cell cycle proteins in oral carcinoma in a population of Brazilian patients. *J Appl Oral Sci*, 16, 340-344.
- Soares RC, Oliveira MC, Souza LB, Costa AL, Medeiros SR, Pinto LP 2007. Human papillomavirus in oral squamous cells carcinoma in a population of 75 Brazilian patients. *Am J Otolaryngol*, 28, 397-400.
- Spíndula-Filho JV, Cruz AD, Oton-Leite AF, Batista AC, Leles CR, Cassia Goncalves Alencar R, Saddi VA, Mendonca EF 2011. Oral squamous cell carcinoma versus oral verrucous

- carcinoma: an approach to cellular proliferation and negative relation to human papillomavirus (HPV). *Tumour Biol*, 32, 409-416.
- Sturgis EM, Cinciripini PM 2007. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*, 110, 1429-1435.
- Sverdrup F, Khan SA 1994. Replication of human papillomavirus (HPV) DNAs supported by the HPV type 18 E1 and E2 proteins. *J Virol*, 68, 505-509.
- Syrjänen KJ, Pyrhonen S, Syrjänen SM, Lamberg MA 1983. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg*, 21, 147-153.
- Syrjänen KJ, Syrjänen SM 1999. Human papillomavirus (HPV) typing as an adjunct to cervical cancer screening. *Cytopathology*, 10, 8-15.
- Syrjänen S 2003. Human papillomavirus infections and oral tumors. *Med Microbiol Immunol*, 192, 123-128.
- Syrjänen S 2004. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol*, 57, 449-455.
- Syrjänen S 2005. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol*, 32 Suppl 1, S59-66.
- Syrjänen S 2007. Human papillomaviruses in head and neck carcinomas. *N Engl J Med*, 356, 1993-1995.
- Syrjänen S, Lodi G, von Bultzingslowen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, Challacombe S, Ficarra G, Flaitz C, Zhou HM, Maeda H, Miller C, Jontell M 2011. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Dis*, 17 Suppl 1, 58-72.
- Talamini R, Vaccarella S, Barbone F, Tavani A, La Vecchia C, Herrero R, Munoz N, Franceschi S 2000. Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. *Br J Cancer*, 83, 1238-1242.

- Temam S, Flahault A, Perie S, Monceaux G, Coulet F, Callard P, Bernaudin JF, St Guily JL, Fouret P 2000. p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Clin Oncol*, 18, 385-394.
- Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, Campisi G 2008. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol*, 19, 1681-1690.
- Valle GF, Banks L 1995. The human papillomavirus (HPV)-6 and HPV-16 E5 proteins cooperate with HPV-16 E7 in the transformation of primary rodent cells. *J Gen Virol*, 76 (Pt 5), 1239-1245.
- Vidal L, Gillison ML 2008. Human papillomavirus in HNSCC: recognition of a distinct disease type. *Hematol Oncol Clin North Am*, 22, 1125-1142, vii.
- Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT, Gupta PC, Hackshaw A, Matos E, Samet J, Sitas F, Smith J, Stayner L, Straif K, Thun MJ, Wichmann HE, Wu AH, Zaridze D, Peto R, Doll R 2004. Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst*, 96, 99-106.
- Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N 1999. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol*, 189, 12-19.
- Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ, Luo Y 2012. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 14, 22-29.
- Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A 2006. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*, 24, 736-747.

- Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX 2002. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene*, 21, 1510-1517.
- Winder DM, Ball SL, Vaughan K, Hanna N, Woo YL, Franzer JT, Sterling JC, Stanley MA, Sudhoff H, Goon PK 2009. Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers. *BMC Cancer*, 9, 440.
- Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA 2003. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol*, 157, 218-226.
- Young LS, Rickinson AB 2004. Epstein-Barr virus: 40 years on. *Nat Rev Cancer*, 4, 757-768.
- Zhao M, Rosenbaum E, Carvalho AL, Koch W, Jiang W, Sidransky D, Califano J 2005. Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. *Int J Cancer*, 117, 605-610.
- zur Hausen H 2002. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2, 342-350.

9. Anexos

Anexo 1a. Cópia do documento de aprovação do projeto original 71/05 emitida pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

Memo 182/05-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 24 de novembro de 2005

A(o): Dr(a) Cibele Rodrigues Bonvicino
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP n° 71/05 (Este n° deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do Projeto – Diversidade genômica do Papillomavirus Humano (HPV) em tumores sólidos

Prezado(a) Doutor(a),

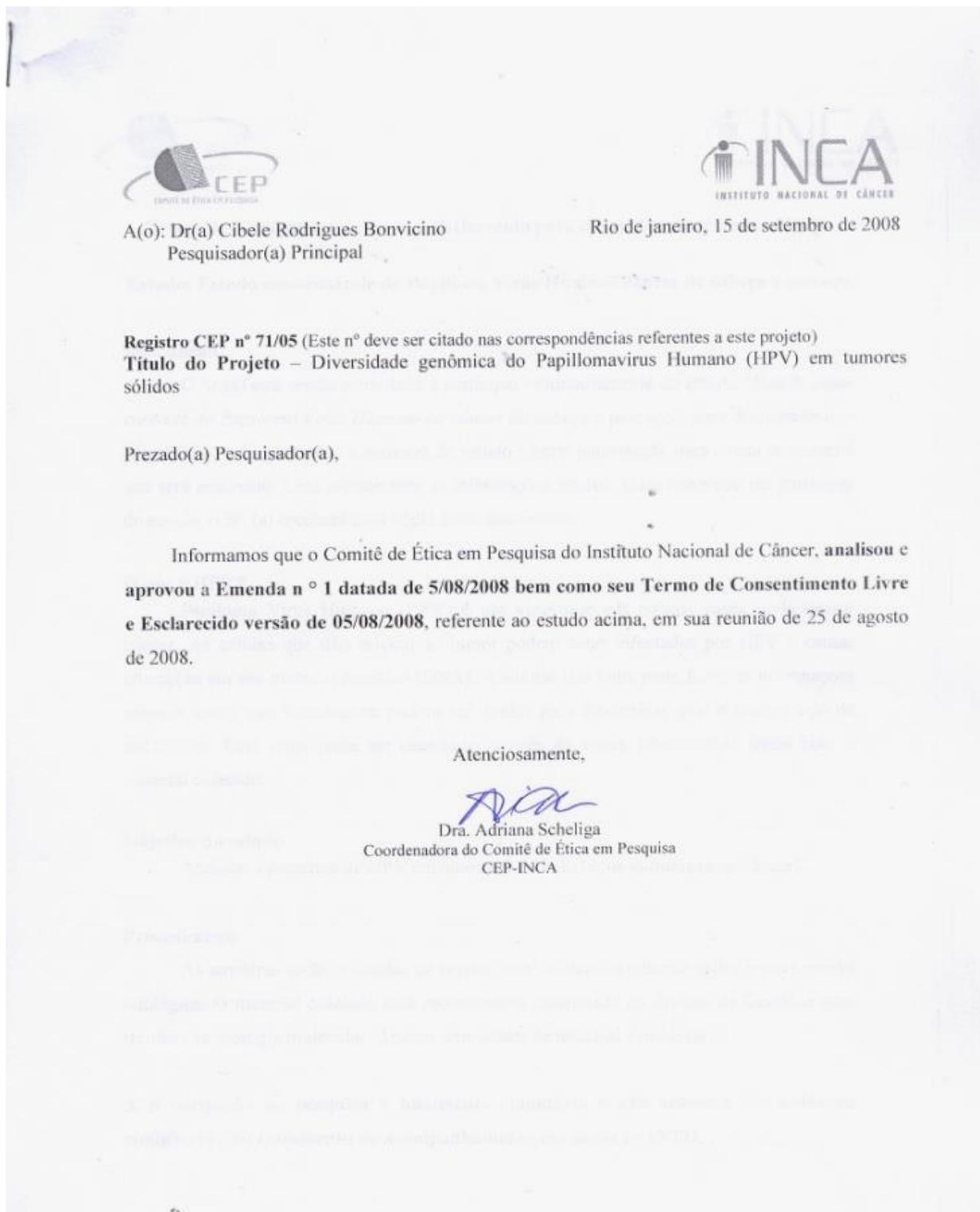
Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após re-análise **aprovou** o Protocolo intitulado Diversidade genômica do Papillomavirus Humano (HPV) em tumores sólidos, bem como seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido em 11 de novembro de 2005.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP - INCA

Anexo 1b. Cópia do documento de aprovação da emenda 1 do projeto 71/05 emitida pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.



Anexo 2. Cópia do documento de aprovação do estudo emitida pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE TRAUMATOLOGIA E ORTOPEDIA

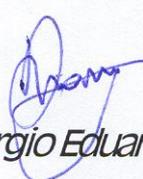
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Certificamos que o projeto intitulado “**Estudo caso controle do papiloma vírus humano no câncer de cabeça e pescoço**”, protocolo nº 0002.1.305.000-09, a ser desenvolvido no INTO, tendo o Instituto Nacional do Câncer como Instituição vinculada e como pesquisador principal **Michelle de Oliveira e Silva**, está de acordo com os princípios éticos estabelecidos pela Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o qual foi APROVADO em 18/02/2009 na reunião do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Traumatologia e Ortopedia (INTO).

O Pesquisador está autorizado a dar início à pesquisa em pauta, devendo atender às seguintes exigências:

- Encaminhar a este CEP, **relatório descritivo de seu andamento ao final de cada semestre;**
- **Ao término da pesquisa, apresentar cópia do trabalho concluído, conforme metodologia exigida pela Instituição, impressa e em mídia.**

Rio de Janeiro, 19 de fevereiro de 2009



Dr. Sérgio Eduardo Vianna

Coordenador do
Comitê de Ética em Pesquisa do INTO

Anexo 3. Versão do TCLE do projeto 71/05 para pacientes com material coletado previamente em cirurgia no INCA e armazenado pelo BNT.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo: Diversidade genômica do Papilomavirus Humano (HPV) em tumores sólidos

Nome do Voluntário: _____

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do estudo “Diversidade genômica do Papilomvirus Humano (HPV) em tumores sólidos” que envolve a doação de parte do material tumoral previamente retirado do senhor(a) durante a cirurgia no Instituto Nacional de Câncer.

O que é HPV?

Papilomavirus Humano (HPV) é um vírus que em poucos casos pode causar câncer. As células que dão origem ao tumor podem estar infectadas por HPV e causar alterações em seu material genético (DNA). A análise dos vírus pode fornecer informações sobre o tumor que futuramente podem ser usadas para determinar qual o melhor tipo de tratamento. Este vírus pode ser detectado por testes laboratoriais feitos com o material coletado.

Objetivos do estudo

- Comparar as características do tecido tumoral e do sangue a fim de detectar possíveis marcadores de câncer que possam favorecer o diagnóstico ou tratamento de futuros indivíduos com câncer de cabeça e pescoço;
- Analisar a amostra de tumor e de sangue para a presença do HPV e a expressão de proteínas que possam estar relacionadas ao desenvolvimento do tumor.

Procedimento

Na ocasião dos procedimentos de rotina realizados neste hospital, o senhor foi convidado a ter o material tumoral retirado em cirurgia e armazenado pelo Banco Nacional de Tumores (BNT) do INCA para estudos futuros. Para este estudo, solicitamos a doação de uma pequena parte deste material armazenado e de sangue também coletado naquela época. Este procedimento não comprometerá o diagnóstico e tratamento do senhor já que parte do material foi também encaminhada ao Serviço de Anatomia Patológica e ao Laboratório de Análises Clínicas do INCA como é rotina para todos os pacientes. Todo o material coletado será processado e examinado no Laboratório de Genética do INCA com técnicas de biologia molecular.

Para que o(a) senhor(a) possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus riscos, benefícios e implicações.

Riscos

O tratamento do Sr(a) será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. Se por algum motivo o seu sangue não esteja armazenado no BNT, a coleta de sangue para o estudo será realizada por uma enfermeira do INCA e coincidirá com a coleta de sangue para os exames rotineiros de forma a não ser prevista punção venosa adicional. Estas punções venosas para exames laboratoriais, que são parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas escuras que desaparecem em poucas horas.

Benefícios

A análise do material cedido pelo(a) senhor(a) pode fornecer informações sobre o desenvolvimento e tratamento do câncer que futuramente poderão ser usadas para ajudar outras pessoas com o mesmo tipo de câncer.

Acompanhamento, assistência e responsáveis

O acompanhamento e assistência ao(a) senhor(a) na instituição continuará o mesmo com ou sem sua participação no projeto.

Caráter confidencial dos registros

Além da equipe de saúde que cuidará do(a) senhor(a), seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA) e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

Tratamento médico em caso de danos

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

Custos (ressarcimento e indenização)

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento por sua participação no estudo.

Bases da participação

É importante que o(a) senhor(a) saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e sua participação no estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

Garantia de esclarecimentos

Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para o **Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino ou Michelle de Oliveira e Silva** no telefone (21) 3207-6589 ou (21) 9624-6151. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo, também pode contar com um contato imparcial, o CEP-INCA, situado à Rua André Cavalcanti 37, Centro, Rio de Janeiro, telefones (21) 3207-6551 ou (21) 3207-6565, ou também pelo e-mail: cep@inca.gov.br

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que poderei ser submetido a exames de adicionais necessários a meu tratamento e não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

Anexo 4. Versão do TCLE do projeto 71/05 para pacientes a serem submetidos à biópsia de tumor de orofaringe.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estudo: Diversidade genômica do Papillomavirus Humano (HPV) em tumores sólidos

Nome do Voluntário: _____

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do estudo “Diversidade genômica do Papillomavirus Humano (HPV) em tumores sólidos” que envolve a realização de uma biópsia e coleta de sangue no Instituto Nacional de Câncer para estudos posteriores. Estes procedimentos não fazem parte do diagnóstico ou tratamento do(a) senhor(a) no INCA, sendo exclusivamente para essa pesquisa.

O que é HPV?

Papillomavirus Humano(HPV) é um vírus que em poucos casos pode causar câncer. As células que dão origem ao tumor podem estar infectadas por HPV e causar alterações em seu material genético (DNA). A análise dos vírus pode fornecer informações sobre o tumor que futuramente podem ser usadas para determinar qual o melhor tipo de tratamento. Este vírus pode ser detectado por testes laboratoriais feitos com o material coletado.

Objetivos do estudo

- Comparar as características do tecido tumoral e do sangue a fim de detectar possíveis marcadores de câncer que possam favorecer o diagnóstico ou tratamento de futuros indivíduos com câncer de cabeça e pescoço;
- Analisar a amostra de tumor e de sangue para a presença do HPV e a expressão de proteínas que possam estar relacionadas ao desenvolvimento do tumor.

Procedimento

Na ocasião dos procedimentos de rotina realizados neste hospital, o(a) senhor(a) será convidado(a) a participar deste estudo. Caso concorde em participar, o(a) senhor(a) será primeiramente encaminhado à uma enfermeira do Banco Nacional de Tumores (BNT) do INCA para responder um questionário. Depois disso, o(a) senhor (a) será encaminhado(a) à um médico da seção de cabeça e pescoço do INCA para realizar uma biópsia, ou seja, retirada de um pequeno fragmento do seu tumor com uso de anestesia local no ambulatório de cabeça e

pescoço. Uma parte deste material coletado será armazenada pelo BNT do INCA e outra parte ficará armazenada no Serviço de Anatomia Patológica do INCA.

A coleta de sangue para o estudo será realizada por uma enfermeira do INCA e coincidirá com a coleta de sangue para os exames rotineiros de forma a não haver punção venosa adicional. Estas punções venosas para exames laboratoriais, que são parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas escuras que desaparecem em poucas horas.

Estes procedimentos não comprometerão o diagnóstico e tratamento do(a) senhor(a) no INCA. Todo o material coletado será processado e examinado no Laboratório de Genética do INCA com técnicas de biologia molecular.

Método alternativo

Caso seja verificada pelo médico cirurgião de cabeça e pescoço alguma dificuldade técnica para realização do procedimento a nível ambulatorial, ou caso seja de preferência do(a) senhor(a), o procedimento da biópsia poderá ser realizado no setor de endoscopia peroral do INCA, com equipe de anestesia e endoscopia.

Para que o(a) senhor(a) possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus riscos, benefícios e implicações.

Riscos

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. O procedimento de biópsia poderá causar um desconforto local que poderá ser resolvido com a indicação de um anestésico pelo próprio médico responsável pelo procedimento.

A coleta de sangue para o estudo será realizada por uma enfermeira do INCA e coincidirá com a coleta de sangue para os exames rotineiros de forma a não haver punção venosa adicional. Estas punções venosas para exames laboratoriais, que são parte de seu tratamento regular, podem resultar em dor no local da punção ou manchas escuras que desaparecem em poucos dias.

Benefícios

A análise do material cedido pelo(a) senhor (a) pode fornecer informações sobre o desenvolvimento e tratamento do câncer que futuramente poderão ser usadas para ajudar outras pessoas com o mesmo tipo de câncer.

Acompanhamento, assistência e responsáveis

O acompanhamento e assistência ao(a) senhor(a) na instituição continuará o mesmo com ou sem sua participação no projeto.

Caráter confidencial dos registros

Além da equipe de saúde que cuidará de você, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA) e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

Tratamento médico em caso de danos

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. Seu tratamento e acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

Custos (ressarcimento e indenização)

Não haverá qualquer custo ou forma de pagamento por sua participação no estudo.

Bases da participação

É importante que o(a) senhor (a) saiba que a sua participação neste estudo é completamente voluntária e que você pode recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de você decidir interromper sua participação no estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e sua participação no estudo será imediatamente interrompida.

O médico responsável por sua internação pode interromper sua participação no estudo a qualquer momento, mesmo sem a sua autorização.

Formulário de Cadastro dos Voluntários

Identificação

Nº:	Data da Entrevista: / /
Início:	Término:
Sexo: Masculino: () Feminino ()	
Informante: ()Próprio ()Outro	Grau de Relacionamento:

1. Endereço: _____

2. Bairro: _____ 3. Cidade: _____ 4. CEP: _____ - _____

5. UF: _____ 6. País: _____ 7. Telefone: _____

8. Contato: _____

9. Há quanto tempo o Sr.(a) mora nesta cidade e estado? _____ anos _____ meses (menos de 1 ano = 0 / ignorado = 99)

ENTREVISTADOR: Caso esteja morando há menos de 1 ano, perguntar onde morava antes e fazer as questões 9 - 11. Caso negativo, seguir da questão 12.

10. Cidade: _____ 11. UF: _____ 12. País: _____

13. Nasc.: ____ / ____ / ____ 14. Idade: _____ anos

15. Situação Conjugal:

- | | |
|-----------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Casado | <input type="checkbox"/> Divorciado |
| <input type="checkbox"/> Solteiro | <input type="checkbox"/> Desquitado |
| <input type="checkbox"/> Separado | <input type="checkbox"/> União Estável |

16. Grau de Instrução:

- | | |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Superior Completo | <input type="checkbox"/> Fund. Completo |
| <input type="checkbox"/> Superior incompleto | <input type="checkbox"/> Fund. Incompleto |
| <input type="checkbox"/> Médio Completo | <input type="checkbox"/> Alfabetização |
| <input type="checkbox"/> Médio Incompleto | <input type="checkbox"/> Analfabeto |

17. Qual última série concluída com aprovação? _____

18. Na sua opinião qual é a sua cor / raça?

- | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------|
| (1) Branca / pele clara / clara | (4) amarela / oriental / asiática |
| (2) Parda / morena / mulata / mestiça | (5) indígena |
| (3) preta / negra / africana / escura | |

19. Classificação de cor / raça feita pelo Entrevistador: _____

ENTREVISTADOR: Caso o voluntário nunca tenha trabalhado, escreva abaixo não se aplica (Código = 0) e passe para o módulo TABACO.

20. Qual a ocupação que o Sr.(a) exerceu por mais tempo?

21. Por quantos anos exerceu esta ocupação? _____

Tabaco

1. Alguma vez na vida, o Sr.(a) fumou cigarro, mesmo uma ou duas tragadas?

Sim Não Ignorado

2. Somando todos os cigarros que o(a) Sr.(a) fumou a vida inteira, o total chega a 5 maços ou 100 cigarros?

Sim Não Ignorado

3. Atualmente o(a) Sr. (a) fuma cigarros diariamente?

Sim Não Ignorado

4. Que tipo de cigarro o(a) Sr.(a) fuma ou fumava? _____

5. Quantos anos o(a) Sr.(a) tinha quando começou a fumar? _____

6. Quantos anos o(a) Sr.(a) tinha quando parou de fumar ou mudou o padrão de consumo, isto é, aumentou ou diminuiu a quantidade de cigarros fumados? _____

7. Quantos cigarros ou maços o(a) Sr.(a) fuma(va)?

Qtd Consumida: _____ Unidade: _____ Frequência: _____

ENTREVISTADOR: Caso o voluntário tenha mudado o padrão de consumo de cigarros em um ou mais período da vida continue preenchendo até que todos os períodos de mudança tenham se esgotado.

ENTREVISTADOR: Ao se marcar “Não” na questão 7, passe para o tópico **ÁLCOOL**.

8. Alguma vez na vida, o Sr.(a) fumou outro produto derivado do tabaco como charutos, cigarrilhas, ou cachimbo?

Sim Não Ignorado

9. A quantidade de charutos, cigarrilhas, ou cachimbo que o(a) Sr.(a) fumou a vida inteira chega a 20?

Sim Não Ignorado

ENTREVISTADOR: Gostaríamos que o(a) Sr.(a) descrevesse os períodos de sua vida em que fumou ou parou de fumar charutos, cigarrilhas e cachimbos, as quantidades que fumou e outros detalhes. Por favor, tente lembrar as mudanças mais importantes quanto a quantidade ou períodos que tenha parado. Ignore as mudanças que ocorreram por períodos muito curtos (menos de 1 ano).

10. Que tipo de outro produto derivado do tabaco o(a) Sr.(a) fuma ou fumava?

11. Quantos anos o(a) Sr.(a) tinha quando começou a fumar esse derivado? _____ anos.

12. Quantos anos o(a) Sr.(a) tinha quando parou de fumar esse derivado ou mudou o padrão de consumo, isto é, aumentou ou diminuiu a quantidade de cigarros fumados? _____ anos.

13. Quantos derivados o(a) Sr.(a) fuma(va)? Qtd. Consumida: _____ Frequência: _____

Álcool

1. Na sua vida, houve algum período que o(a) Sr.(a) tenha tomado pelo menos uma dose de bebida alcoólica todos os meses, ou seja, pelo menos uma vez por mês?

Sim

Não

Ignorado

ENTREVISTADOR: Gostaríamos que o(a) Sr.(a) descrevesse os períodos de sua vida em que bebeu ou parou de beber, o tipo de bebida, as quantidades que consumiu e outros detalhes. Por favor, tente lembrar as mudanças mais importantes quanto a quantidade ou períodos que tenha parado. Ignore as mudanças que ocorreram por períodos muito curtos (menos de 1 ano) ou bebidas consumidas ocasionalmente (menos de 1 vez por mês).

2. Que tipo de bebida o(a) Sr.(a) toma ou tomava?

3. Quantos anos o(a) Sr.(a) tinha quando começou a beber? _____ anos.

4. Quantos anos o(a) Sr.(a) tinha quando parou de beber ou mudou o padrão de consumo, isto é, aumentou ou diminuiu a quantidade de bebida consumida? _____ anos.

5. Quantas doses de bebida o(a) Sr.(a) bebia?

Nº de doses: _____

Unidade: _____

Frequência: _____

6. Em que situação o(a) Sr.(a) costuma / costumava beber?

Durante a semana

Nos finais de
semana

Nas refeições

Entre as refeições

Sim

Sim

Sim

Sim

Não

Não

Não

Não

Ignorado

Ignorado

Ignorado

Ignorado

Saúde e Hábitos Sexuais

1. Com que frequência você lava suas mãos após ir ao banheiro?
 Nunca
 Raramente
 As vezes
 Sempre
 Não sabe
2. Nos últimos 2 anos, o(a) Sr.(a) consultou um odontologista para uma rotina ?
 Sim
 Não
 Ignorado
3. Nos últimos 12 meses, o(a) Sr.(a) escovou os dentes quase todos os dias ou diariamente?
 Sim
 Não
 Ignorado
4. Quantas vezes por dia o(a) Sr.(a) costuma escovar os dentes?
 nenhuma
 1 vez/dia
 2 vezes/dia
 3 vezes/dia
 após cada refeição
5. O(a) Sr.(a) costuma fazer uso de enxaguante bucal?
 Sim
 Não
 Ignorado
6. Alguma vez, o(a) Sr.(a) teve verrugas (papilomas), em sua boca ou garganta?
 Sim
 Não
 Ignorado
7. O(a) Sr.(a) já fez cirurgia para remoção de amígdalas?
 Sim
 Não
 Ignorado
8. Alguma vez, o(a) Sr.(a) teve uma doença sexualmente transmissíveis (DST)?
 Sim
 Não
 Ignorado
9. Qual DST o(a) Sr.(a) já diagnosticou?
 Gonorréia
 Sífilis
 Clamídia
 Herpes genital
 HPV
 Trichomonas
 outras _____
10. Alguma vez, o(a) Sr.(a) já foi testado(a) para o HIV, o vírus que causa a SIDA?
 Sim
 Não
 Ignorado

SOMENTE MULHER

1. Alguma vez, a Sra. realizou uma citologia oncológica (Papanicolau / preventivo)?
 sim
 Não
 Ignorado
2. Quantas vezes a Sra. realizou este exame?
 6 / 6 meses
 uma vez / ano
 uma vez de 2 anos
 uma vez de 5 em 5 anos
 uma vez a cada 10 anos, ou mais

3. Qual é a sua preferência sexual?

- heterossexual bissexual
 homossexual ignorado

4. Qual era a sua idade quando a Sra. teve sua primeira relação sexual? _____ anos

5. Em seu tempo de vida, com quantos homens a Sra. já teve relações sexuais?

- 1 - 5 16 - 25 > 100
 6 - 10 26 - 50 Ignorado
 11 - 15 50 - 100

6. A Sra. utiliza preservativos (camisinha) nas relações sexuais?

- Nunca Sempre
 Raramente Ignorado
 Geralmente

7. A Sra. já realizou sexo oral?

- Sim Não Ignorado

8. Em seu tempo de vida, com quantos homens a Sra. já realizou sexo oral?

- 1 - 5 16 - 25 > 100
 6 - 10 26 - 50 Ignorado
 11 - 15 50 - 100

9. A Sra. utiliza preservativos (camisinha) no sexo oral?

- Nunca Geralmente Ignorado
 Raramente Sempre

10. Para seu conhecimento algum parceiro já teve câncer de boca, língua, laringe, cérvix, útero, vulva, anus ou pênis?

- Sim Não Ignorado

11. Qual tipo de câncer?

- Cervical Anal Boca
 Vulva Pênis Ignorado

SOMENTE HOMENS

1. Alguma vez, o Sr. consultou um urologista?

- Sim Não Ignorado

2. Qual é a sua preferência sexual?

- heterossexual bissexual
 homossexual ignorado

3. Qual era a sua idade quando o Sr. teve sua primeira relação sexual? _____

4. Em seu tempo de vida, com quantas mulheres o Sr. já teve relações sexuais?

- 1 - 5 16 - 25 > 100
 6 - 10 26 - 50 Ignorado
 11 - 15 50 - 100

5. A Sr. utiliza preservativos (camisinha) nas relações sexuais?

- Nunca Sempre
 Raramente Ignorado
 Geralmente

6. O Sr. já realizou sexo oral?

- Sim Não Ignorado

7. Em seu tempo de vida, com quantas mulheres o Sr. já realizou sexo oral?

- 1 - 5 16 - 25 > 100
 6 - 10 26 - 50 Ignorado
 11 - 15 50 - 100

8. O Sr. utiliza preservativos (camisinha) no sexo oral?

- Sim Não Ignorado

9. Para seu conhecimento algum parceiro já teve câncer de boca, língua, laringe, cérvix uterino, vulva, anus ou pênis?

- Sim Não Ignorado

10. Qual tipo de câncer?

- Cervical Anal Boca
 Vulva Pênis Ignorado

Câncer

1. Começando pela sua **mãe**, ela teve câncer?

- Sim Não Ignorado

2. E o seu **pai**, ele teve câncer?

- Sim Não Ignorado

3. Os seus **pais** são parentes entre si?

- Sim Não Ignorado

4. A sua **Avó materna** teve câncer?

- Sim Não Ignorado

5. O seu **Avô materno** teve câncer?

- Sim Não Ignorado

6. A sua **Avó paterna** teve câncer?

- Sim Não Ignorado

7. O seu **Avô paterna** teve câncer?
() Sim () Não () Ignorado
8. Quantas **irmãs** o(a) Sr.(a) tem ou teve, incluindo meia-irmã? _____
9. Alguma de suas **irmãs** teve câncer?
() Sim () Não () Ignorado () Quantos
10. E **irmãos**, quantos irmãos o(a) Sr.(a) tem ou teve, incluindo meio-irmãos? _____
11. Algum de seus **irmãos** teve câncer?
() Sim () Não () Ignorado () Quantos
12. Quantas **filhas** o(a) Sr.(a) tem ou teve? _____
13. Alguma de suas **filhas** teve câncer?
() Sim () Não () Ignorado () Quantos
14. E **filhos**, quantos o(a) Sr.(a) tem ou teve? _____
15. Algum de seus **filhos** teve câncer?
() Sim () Não () Ignorado () Quantos
16. Quantas **tias maternas** o(a) Sr.(a) tem ou teve? _____
17. Alguma de suas **tias maternas** teve câncer?
() Sim () Não () Ignorado () Quantos
18. Quantos **tios maternos** o(a) Sr.(a) tem ou teve? _____
19. Algum de seus **tios maternos** teve câncer?
() Sim () Não () Ignorado () Quantos
20. Quantas **tias paternas** o(a) Sr.(a) tem ou teve? _____
21. Alguma de suas **tias paternas** teve câncer?
() Sim () Não () Ignorado () Quantos
22. Quantos **tios paternos** o(a) Sr.(a) tem ou teve? _____
23. Algum de seus **tios paternos** teve câncer?
() Sim () Não () Ignorado () Quantos
24. O(a) Sr.(a) tem ou teve câncer?
() Sim () Não () Ignorado

ENTREVISTADOR: Ao se marcar “Não” na questão 24, finaliza-se a entrevista, caso marque sim, prossiga.

25. Quantas vezes o(a) Sr.(a) teve câncer? _____

26. O(a) Sr.(a) já fez algum tratamento pra este câncer?

Sim Não Ignorado Quantos

27. Qual tratamento?

- Cirurgia
- Hormônio-terapia
- Quimioterapia
- Crioterapia
- Imunoterapia
- Radioterapia
- Laserterapia
- Fotocoagulação
- TMO

Obrigado por preencher este formulário!

Somente as pessoas diretamente envolvidas neste estudo terão acesso a este formulário e ele nunca será fornecido a qualquer pessoa para qualquer outra finalidade.

Anexo 6. Versão do TCLE aprovado pelo CEP do INTO para inclusão dos indivíduos do grupo-controle.

Introdução

O Sr.(a) está sendo convidado a participar de um estudo sobre a importância do HPV (Papilomavirus Humano) no câncer de cabeça e pescoço. **Para esse estudo precisamos de amostras de indivíduos saudáveis (sem doença) e por isso o Sr(a). está sendo convidado.** Este documento é para informar sobre o que é o estudo e obter sua autorização para a coleta de material que será analisado. Leia atentamente as informações abaixo e nos pergunte sobre qualquer dúvida que tiver.

O que é HPV?

Papilomavirus Humano (HPV) é um vírus que em poucos casos pode causar câncer. A análise deste vírus por testes de laboratório pode, futuramente, fornecer informações importantes sobre o tratamento de algumas doenças.

Objetivo do estudo

Analisar a presença do vírus HPV na saliva de indivíduos saudáveis (sem doença).

Procedimento

Antes da coleta de saliva o Sr(a). será entrevistado através de um questionário sobre alguns hábitos de vida como uso de tabaco e álcool e também sobre hábitos sexuais. Caso o Sr(a). concorde em responder o questionário, a seguir, sua saliva será coletada na sua boca, apenas uma única vez, utilizando uma pequena escova estéril descartável. Esta coleta é superficial e não provoca dor ou qualquer outro tipo de desconforto.

Risco/ desconfortos e benefícios

Esse estudo não traz nenhum risco ou benefício ao Sr(a). Após o término do estudo, as informações obtidas poderão beneficiar futuramente os portadores do HPV.

Confidencialidade

Seu nome não constará no questionário e todas as informações coletadas serão mantidas em sigilo e serão anônimas (não serão relacionadas ao seu nome ou à sua pessoa).

Ressarcimento e Indenização

O presente estudo tem finalidade científica sem fins lucrativos, não havendo, portanto, nenhum ressarcimento ou indenização dos sujeitos que participam do estudo.

Maiores esclarecimentos sobre dúvidas que o Sr.(a) possa ter sobre este estudo podem ser obtidos nos endereços e telefones abaixo:

Ma. Michelle de Oliveira e Silva – Doutoranda do Programa de Doutorado em Biologia Celular e Molecular da FIOCRUZ. Tel. (21) 9624-6151.

Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino – Programa de Genética – INCA. Endereço: Rua André Cavalcanti 37/ 4º andar. Tel. (21) 3233-1486.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Página de assinaturas

Eu _____
____, RG _____, abaixo assinado (a) concordo de livre e espontânea vontade participar como voluntário do estudo “**Estudo caso-controle do Papilomavírus Humano (HPV) no câncer de cabeça e pescoço**”.

Confirmo que:

- Li todas as informações contidas neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tirei minhas dúvidas;
- Concordo livremente em doar material coletado na boca para realização do estudo;
- Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento que eu desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- Recebi uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

De acordo com o exposto neste documento, atesto minha participação voluntária no projeto intitulado “estudo “**Estudo caso-controle do Papilomavírus Humano (HPV) no câncer de cabeça e pescoço**”, autorizando a coleta de material pelo grupo de pesquisadores da FIOCRUZ, do INCA e do INTO.

Rio de Janeiro, _____ de _____ de _____.

Nome do paciente: _____

Assinatura do paciente: _____

Nome e assinatura do responsável pela obtenção do consentimento informado:

Anexo 7. Construção dos *cell-blocks* a partir de linhagens celulares.

O volume de células concentradas em *pellet* necessário é de aproximadamente 0,5 mL. Para isso, aproximadamente três garrafas de 150 cm² com cultura de células confluentes são requeridas.

Na utilização de células monocamadas aderentes não tripsinizar as células para evitar a destruição de marcadores protéicos de superfície celular. As células aderidas devem ser raspadas da garrafa com auxílio de espátula estéril para a solução de meio de cultura e submetidas às seguintes etapas:

1. Transferir as células para um tubo de polipropileno de 50 mL;
2. Centrifugar por 7 minutos a 200 x g a temperatura ambiente;
3. Aspirar e descartar o sobrenadante;
4. Lavar o *pellet* com 15 ml de PBS 20X (com uma pipeta Pasteur sem ressuspender);
5. Centrifugar novamente caso o *pellet* tenha sido desfeito por 3 minutos a 200 x g, a temperatura ambiente;
6. Adicionar formol 10% a 4°C e incubação *overnight*;
7. Transferir cuidadosamente o *pellet* para um papel filtro de forma que o mesmo caiba embrulhado em cassete para preparação histopatológica;
8. Colocar o *cell-block* embrulhado em papel filtro no cassete;
9. Processar de acordo com a técnica de preparação histopatológica.

OBS. Caso a preparação do bloco não possa ser feita imediatamente após a fixação, remover o formol e incubar a 4°C com 20 mL de etanol 70% SEM ressuspender o *pellet* pelo período de até 24h. Não congelar as células. Seguir a partir do item número 7.

Anexo 8. Imuno-histoquímica para p16INK4a

Etapa de desparafinização e hidratação dos cortes nas lâminas de TMA:

1. Manter as lâminas em estufa a 60°C por 30 minutos;
2. Realizar três etapas de lavagens das lâminas em solução de xilol por 10 minutos cada;
3. Incubar as lâminas por cinco minutos em cada uma das concentrações descendente de etanol a seguir: 100%, 80% e 70%, seguida por posterior incubação por cinco minutos em tampão de lavagem do conjunto de reagentes.

Recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e ligação dos anticorpos

4. Aquecer as lâminas por um minuto em solução *Epitope Retrieval* a 120°C em panela de pressão;
5. Manter as lâminas por 20 minutos à temperatura ambiente;
6. Realizar três lavagens de cinco minutos cada utilizando o tampão de lavagem;
7. Incubar as lâminas com solução *Peroxidase-Blocking* do conjunto de reagentes;
8. Lavar as lâminas por cinco minutos com tampão de lavagem;
9. Adicionar às lâminas 300 µl de anticorpo primário (*Mouse Anti-Human p16^{INK4A}*);
10. Incubar em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente;
11. Lavar as lâminas por cinco minutos três vezes com tampão de lavagem;
12. Adicionar às lâminas 300 µl de anticorpo de ligação (*Visualization solution*);
13. Incubar em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente;
14. Lavar as lâminas cinco minutos três vezes com tampão de lavagem;
15. Adicionar às lâminas 300 µl da solução substrato-cromógeno (DAB);
16. Incubar em câmara úmida por cinco minutos à temperatura ambiente;
17. Lavar as lâminas por cinco minutos em tampão de lavagem;

Contra-coloração, desidratação e montagem das lâminas

18. Incubar as lâminas em solução de hematoxilina de Harris por 30 segundos;
19. Lavar em água corrente por cinco minutos;
20. Desidratar as lâminas através de banhos de cinco minutos em cada uma das sucessivas soluções com concentrações crescentes de etanol (70%; 80%; seguida de duas lavagens de etanol 100%);
21. Lavar as lâminas por cinco minutos em cada uma das duas vezes em xilol 100%;
22. Montar as lâminas.

Anexo 9. Protocolo de hibridização *in situ* para detecção do EBV.

Etapa de desparafinização das lâminas de TMA:

1. Realizar três etapas de lavagens das lâminas em solução de Xilol por 10 minutos cada;
2. Incubar as lâminas por três minutos em cada uma das soluções de etanol a seguir:
Duas vezes em etanol 100%; duas vezes em etanol 96%; uma vez em etanol 80%, uma vez em etanol 70% e posterior incubação em água destilada.

Preparar para as etapas seguintes:

Cubetas, câmara úmida (com DEPC+formamida), ajustar a estufa para 53°C).

Etapa de hidratação:

3. Incubar as lâminas em água DEPC até o preparo da solução 1 com 5 mL de HCl 2N + 45 mL de água DEPC;
4. Descartar a água DEPC e incubar as lâminas na solução 1 por 20 minutos;
5. Descartar a solução 1 e incubar as lâminas em PBS;
6. Preparar a solução 2 com 100 mL PBS 10X + 90 mL DEPC;
7. Preparar a solução 3 com adição de 50 mL da solução 2 e 200 µL de Pronase (mantida à -20°C);
8. Descartar a solução de PBS da cubeta e adição da solução 3 seguida de incubação por 10 minutos;
9. Descartar a solução 3, adição da solução 4 com 50 mL de PFA 4% e incubação por 20 minutos;
10. Descartar a solução 4 e adição do volume restante da solução 2 seguida de incubação por 1 a 3 minutos.

Etapa de desidratação:

11. Incubar as lâminas em solução de etanol 70% por 3 minutos;
12. Incubar as lâminas em solução de etanol 100% por 3 minutos;
13. Incubar as lâminas a temperatura ambiente até a completa secagem do material.

OBS. É possível parar nesta etapa e continuar no dia seguinte.

Preparar previamente para as etapas seguintes:

Ligar um termobloco a 80°C (para incubação da sonda por 30 segundos antes da reação) e outro a 50°C (para incubação da solução de dextransulfato).

Primeiro dia da hibridização *in situ*:

14. Preparar o mix de hibridização (volume final por reação de 50 μ L)

OBS1: Contar TMA como 2 amostras;

OBS2: Atenção para a ordem e as incubações abaixo destacadas.

% do vol.final	Reagente	x1 (μ L)	Ordem
50	Formamida	25	2
10	SSC 20X	5	3
1	Yeast-T-RNA	0,5	4
20	Dextransulfato	10	5
1	Sonda EBER1 (AS)	0,5	6
1	Sonda EBER2 (AS)	0,5	6
qsp.	H2O DEPC qsp.	8,5	1
	Total	50	

15. Vortexar o mix e em seguida dar um *spin*;

16. Adicionar 50 μ L do mix colocando pequenas gotas sobre o tecido;

17. Incubar *overnight* as lâminas em estufa a 53°C em câmara úmida. Incubar também as duas soluções a serem utilizadas no próximo na estufa juntamente com as lâminas.

Preparo das soluções do segundo dia de reação:

Solução 1 (Vf=100mL)		Solução 2 (Vf=150mL)	
45mL	H2O DEPC	135mL	H2O DEPC
5mL	SSC 20X	15mL	SSC 20X
50mL	Formamida		

Segundo dia da hibridização *in situ*:

18. Incubar as lâminas em 50 mL da solução 1 por 1h na estufa a 53°C;
19. Descartar a solução 1 e repetição da etapa 18 colocando uma nova solução 1;
20. Descartar a solução anterior e incubação com 50 mL da solução 2 por 20 min a 37°C;
21. Descartar a solução anterior e incubação com 50 mL de uma nova solução 2 com 100 µL de RNase A (mantida a -20°C) por 20 min a 37°C;
22. Descartar a solução anterior e incubação com os restantes 150 mL da solução 2 por 10 min a temperatura ambiente;
23. Incubar as lâminas em tampão Tris até as etapas seguintes de imunohistoquímica;
24. Incubar com anticorpo secundário por 30 min a temperatura ambiente;
25. Lavar as lâminas com PBS (3 banhos por 2 min cada);
26. Incubar com 300uL de HRP polímero (Strepatvidina) por 30 min;
27. Lavar as lâminas com PBS (3 banhos por 2 min cada);
28. Preparar da solução: 1250 de tampão + 1 gota de DaB;
29. Incubar por até 5 min com a solução DaB (quando há casos bem marcados visualmente pode-se parar a reação);
30. Lavar das lâminas com PBS por 5 min;
31. Incubar por 1 min em hematoxilina;
32. Lavar as lâminas por 4 min em água corrente;
33. Incubar as lâminas *overnight* para secagem completa do material;
34. Realizar os banhos seriados de 1/1 min em:
70%, 80%, 96%, Abs, Abs, Xilol, Xilol
35. Montar as lâminas.

Anexo 10. Cópia do documento de aprovação do projeto original 19/05 emitida pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Instituto Nacional de Câncer
Comitê de Ética em Pesquisa-INCA

A: Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino
Pesquisadora Principal

Rio de Janeiro, 08 de dezembro de 2005

Registro CEP nº 19/05 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do projeto: Genotipagem do Papillomavirus humano (HPV) em amostras cervicais de mulheres do Estado do Rio de Janeiro

Prezada Doutora,

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após reanálise decidiu **aprovar** o Protocolo intitulado: Genotipagem do Papillomavirus humano (HPV) em amostras cervicais de mulheres do Estado do Rio de Janeiro, do qual a Sra. é a Pesquisadora Principal em 06 de dezembro de 2005.

2. Estamos encaminhando a documentação pertinente para o CONEP, com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

Anexo 11. Artigo publicado durante o período de doutorado. Oliveira-Silva M, Lordello CX, Zardo LM, Bonvicino CR, Moreira MA 2011. Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. *Viol J.* 5;8:4.

RESEARCH

Open Access

Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions

Michelle Oliveira-Silva^{1†}, Camila X Lordello^{2,3†}, Lucília MG Zardo⁴, Cibele R Bonvicino^{1,3}, Miguel AM Moreira^{3*}

Abstract

Background: Human Papillomavirus (HPV) high-risk (HR) types are the causal factor for cervical cancer and premalignant dysplasia. Data on frequency of HPV types provide a basis to design and evaluate HPV prevention programs. Taking into account the heterogeneity of HPV types across and within populations this study aims to access the HPV frequency in Brazilian women.

Results: We identified 24 different types of HPV, including a *Betapapillomavirus* and a likely new type, previously reported, from 132 women positive for the virus analysed by Hybrid Capture II assay. These women were infected by a single or multiple HPV types and 142 HPV strains were identified. HR types were found in 75% of women and HPV types 16, 18, 45, 58, and 66 had the highest frequency. Significant differences in frequency of HR HPV types were found for presence of cervical lesions, and for different HPV species and women age.

Conclusions: Compared with previous studies in Brazil, our data indicated differences in frequency and HPV type diversity, a significant association of other HR-types but HPV16 and 18 and cervical lesions, and a trend for distinct distribution of HPV types by age.

Background

Cervical cancer accounts for the third highest mortality amongst cancers in women worldwide, with a higher incidence and frequency in underdeveloped and developing countries [1]. The etiology of cervical cancer, attributed to the high-risk types (HR) of Human Papillomavirus (HPV), has been well established by experimental and epidemiological studies [2-4]. Due to the discovery of more than 100 HPV types and the association of some types with cancer, pre-cancerous lesions and genital warts [5], a series of assays based on Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification and nucleic acid hybridization were designed for HPV detection. HPV16 and HPV18 are the most types reported, accounting for approximately 70% of all cervical cancers [6] and are also frequent in women lacking cytological abnormalities in different continents [7,8].

The high frequency of HPV16 and HPV18 in cervical cancer and pre-cancerous lesions lead to development of vaccines against L1 viral capsid proteins of these

types [9,10]. However, the distribution and prevalence of HR-HPV types have been shown to vary among populations worldwide [7,11-13] and also in Brazil [14-24], where most of studies were performed in Southeast region, employing different methodologies for HPV detection and typing showing, particularly for HPV18, the largest variation in prevalence [25]. Considering the use of different methodologies for HPV typing, the DNA sequencing is the only procedure capable to recognize all HPV types and variants present in a biological specimen. Despite of direct sequencing is not adequate for the identification of multiple infections, preferentially detecting types over-represented in a sample [26], this method has been used in many studies on HPV prevalence [27-30].

Taking in account that the characterization of HPV types will be valuable to implement immunization polices and to monitor the presence of different HPV types, the present study aim to accesses the diversity of HPV types in women from communities of low socioeconomic status of the Metropolitan region of the city of Rio de Janeiro city, Brazil.

* Correspondence: miguelm@inca.gov.br

† Contributed equally

³Genetics Division, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Methods

Study Subjects

We studied women from Duque de Caxias and Nova Iguaçu, two municipalities with low socioeconomic status in the state of Rio de Janeiro, Brazil, assisted by the governmental Family Health Program. They had been visited by trained health care professionals and invited to participate in studies for evaluating the efficacy of different methods for detecting cervical lesions [31], and the Hybrid Capture II (HCII) assay for early detection of cervical cancer [32], and also the quality of records on cervical cancer in Brazil [33]. Socio-demographic, cytological data and endocervical samples of these women, collected between December 2001 and July 2002, were used in the present study. Pap tests had not been carried out in any of these women in the last three years before sample collections; they had not been pregnant, had not given birth at least six months before inclusion, have had sexual relation, had not gone through hysterectomy, and were between 25 and 59 years of age. Endocervical samples were obtained using a conical-shaped brush and stored at -20°C in Digene Specimen Transport Medium™ under denaturing conditions. In this present study, only HPV+ women diagnosed previously by HCII assay were analyzed, totalizing 297 women. This study was approved by the Ethics Committee of the Instituto Nacional de Câncer (registration number 19/05).

The conventional cytology results was classified according to the recommendations of Brazilian Ministry of Health and Brazilian Society of Cytology [26], which is based on Bethesda's definition [34].

Extraction, Amplification and HPV DNA Typing

Samples were submitted to pH neutralization step with addition of HCl 1N. DNA isolation was carried out with QIAamp DNA Mini and Blood Kit (QIAGEN, Helden, Germany) following the manufacturer's instructions, modified at the elution step that was performed with 30 µL of AE buffer.

HPV DNA amplification was performed by nested-PCR with MY09/11 [35] and GP05/06+ [36] primers, the amplicons were purified with the Illustra GFX PCR and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, UK) before being submitted to direct sequencing, using Big Dye Terminator Kit V3.1 (Applied Biosystems), in a ABI 3730 sequencer at the Genomic DNA Sequencing Platform (PDTIS) of FIOCRUZ [37]. The samples that could not be typed by direct sequencing due to overlap of sequence-peaks were cloned with pMOSBlue Blunt Ended kit (GE Healthcare, UK) and eight clones were sequenced for each patient.

Identification of HPV types was carried out with the Blast software <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> and by phylogenetic analysis within the MEGA 4.0

software [38] applying Neighbor-Joining and Kimura's-2-Parameter (K2P) distance model. Phylogenetic analysis included reference sequences from *Alphapapillomavirus*. Sequences from *Betapapillomavirus* and *Deltapapillomavirus* were used as outgroups. The strength of each node was evaluated by bootstrap test with 1,000 replicates. HPV types were epidemiologically and phylogenetically classified following Muñoz et al [5] and de Villiers et al [39], respectively.

Statistical Analysis

Association between HPV types and cytology results for women with single infection was performed with the χ^2 test. Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to analyze differences between age at diagnoses and HPV type for all women.

Results

A total of 297 women positive for HCII assay had samples available for DNA isolation and 132 of these had HPV DNA successfully amplified. Despite this, there were no significant differences in respect to the cytological results (ASCUS, AGUS, LSIL and HSIL) and age between women that had HPV DNA successfully amplified and those that not had. The mean age of the 132 women were 39.5 years, ranging from 25 to 59 years of age.

A total of 123 women had the HPV type identified totalizing 142 HPV sequences corresponding to women infected with single, multiple HPV types or by different strains of the same type (GenBank accession numbers HQ834551 - HQ834692). Infections by multiple HPV types or by different strains were found among the 39 women that could not be typed by direct sequencing due to overlap of sequence-peaks and were submitted to molecular cloning and clone sequencing. HPV typing carried out with Blast and confirmed by phylogenetic analysis showed the presence of 24 different HPV types, including HPV17, a *Betapapillomavirus* often identified in cutaneous lesions [39], and a new likely type previously reported as SW1 [40]. One hundred and twelve women were found to be infected by a single HPV type and 11 showed co-infection, 9 of which by two types and two by three types. Among 132 women that had the HPV type amplified, 63.6% (84/132) had no cervical lesions, 14.4% (19/132) had atypical squamous cells of undetermined significance (ASCUS) or atypical glandular cells of undetermined significance (AGUS), 9.8% (13/132) had low-grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and 19.7% (26/132) had high-grade squamous intraepithelial lesion (HSIL) (Table 1).

The frequency of HPV HR-types among HPV+ women was 75% (99/132 women), with a highest frequency for HPV16 (28%; 37/132), followed by HPV18

Table 1 HPV type and cytological results of the 132 HPV+ women

		Cytological results*						No. women
		HPV type	Normal	ASCUS	AGUS	LSIL	HSIL	
Single Infection (N = 112)	High-Risk	16	19	3	1	1	6	29
		18	13	1	1	0	1	15
		31	3	0	0	1	1	5
		33	4	0	0	0	0	4
		35	1	0	0	0	2	3
		39	1	0	0	1	0	2
		45	4	0	0	1	4	9
		53	2	0	0	0	2	4
		58	5	1	2	2	2	9
	66	4	2	0	0	2	8	
	Low-Risk	6	5	0	0	1	1	7
		43	0	1	1	0	1	2
	Unknown-Risk	17	0	0	0	1	0	1
		70	4	1	0	0	1	6
		74	1	0	0	1	0	1
		82	1	0	0	0	0	1
		83	0	1	0	3	1	3
89		1	0	0	0	0	1	
90		1	0	0	0	0	1	
SW1	1	0	0	0	0	1		
Multiple Infection (N = 11)	Double	16, 66	1	0	0	0	0	1
		30, 35	0	1	0	0	0	1
		16, 83	1	1	1	0	0	2
		18, 83	1	0	0	0	0	1
		16, 18	1	0	0	0	1	2
		18, 72	1	0	0	0	0	1
		16, 45	1	0	0	0	0	1
	Triple	16, 52, 83	0	0	0	0	1	1
6, 16, 56		1	0	0	0	0	1	
HPV type not identified			7	1	0	1	0	9
Total								132

*ASCUS, Atypical squamous cells of undetermined significance; AGUS, Atypical glandular cells of undetermined significance; LSIL, Low-grade squamous intraepithelial lesion; HSIL, High-grade squamous intraepithelial lesion.

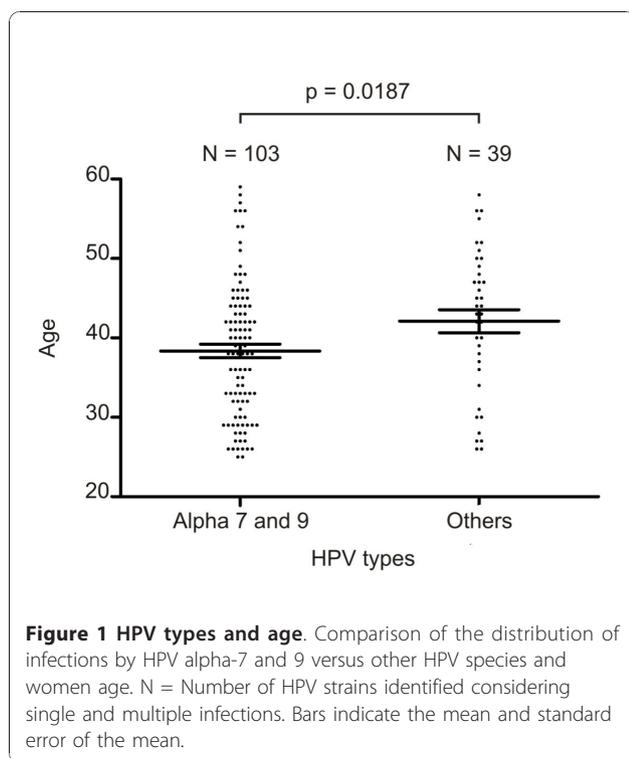
(14.4%; 19/132), HPV45 (7.6%; 10/132), HPV58 (6.8%; 9/132), HPV66 (6.8%; 9/132), HPV31 (3.8%; 5/132) and HPV33 (3.0%; 4/132). Considering only the 84 HPV+ women with normal cytology, we found frequencies of 28.6% (24/84) for HPV16 and 19.0% (16/84) for HPV18.

A significant lower proportion of LSIL and HSIL was found among women infected by HPV16 and/or HPV18 when compared to the ones infected by other HR-types (χ^2 test, $p = 0.0411$). Our data also showed that infection by alpha-7 (including HPV18, 39, 45, 59, 68 and 70) and alpha-9 species (including HPV16, 31, 33, 35, 52, 58 and 67) presented a significant distinct distribution by age at diagnosis respective to women positive for other HPV types (Mann-Whitney test, $p = 0.0187$)

(Figure 1). However, separate comparisons among alpha-7 infections, alpha-9 infection, and infections by other HPV types, did not show a significant different distribution by age (Kruskal-Wallis test, $p = 0.06$).

Discussion and Conclusions

All cervical samples included in the present study were HPV+ by the HCII assay, which include probes for detection of 18 *Alphapapillomavirus* types (HR types: HPV16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 and 68; LR types: HPV6, 11, 42, 43 and 44). However, we identified 12 HPV types (HPV17, 30, 53, 66, 70, 72, 74, 82, 83, 89, 90 and SW1) not included in that set of probes. These findings reinforced previous evidence of cross-hybridizations



among probes used in HCII test [41-45]. Interestingly, the *Betapapillomavirus* HPV17 was also identified, a type frequently associated to cutaneous lesions, indicating that probes contained in the HCII test were capable of cross-hybridizing with viruses not belonging to *Alphapapillomavirus*.

In Brazil, most studies on HPV frequency used as inclusion criteria the suspicion of HPV infection, presence of cervical lesions or cancer. In our study, these criteria were not used, a reason why we compared our findings with studies with similar inclusion criteria [15,19-24]. Three of these studies were performed in Northeast region, two in the same city (Recife), and the HPV frequency reported were discrepant among them and also in comparison with our study. Franco et al [21], carried out a study with 122 HPV+ in João Pessoa city, using dot blot hybridization method for typing and found a lower frequency of HPV45 (3.1%) and higher frequency of HPV33 (13.5%) than here reported (7.6% and 3.0%, respectively). In Recife city, Lorenzato et al [22] analyzing 214 HPV+ women and using PCR/RFLP for HPV typing, found a higher frequency of HPV31 (21.4%) and a lower frequency of HPV18 (2.4%) in comparison with our findings (3.8% and 14.4%, respectively). The third study by Baldez et al [20], also conducted in Recife, analyzed 213 HPV+ women using specific primers for PCR amplification of four HPV types and found a higher frequency of HPV16 (78%) and HPV31 (15.5%), and lower frequency of HPV18 (2.8%) in respect

to our data (28.0% of HPV16; 3.8% of HPV31 and 14.4% of HPV18).

In a study performed in Metropolitan region of Rio de Janeiro city at the Southeast region of Brazil, Oliveira et al [19] analyzing 82 HPV+ young women (between 14 to 26 years old), using PCR/RFLP for HPV typing, reported a higher frequency of HPV31 (12.2%) than the one found by us (3.8%), and accounting for the second most frequent type after HPV16. In addition, a lower frequency for HPV16 (18.3%) and HPV18 (2.4%) were observed in comparison to our data (28.0% and 14.4%, respectively). In state of São Paulo, also in Southeast region of Brazil, Lippman et al [15], analyzed 135 HPV+ women of 18 to 40 years of age, and employing PCR/RFLP for HPV typing, detected a large diversity of HPV types with lower frequencies for HPV16 (17%), HPV45 (2.2%), HPV58 (4.4%) and HPV66 (2.2%) in comparison to our data (28.0% for HPV16; 7.6% for HPV45; 6.8% for HPV58 and 6.8% for HPV66).

In two studies performed at the South region of Brazil, the first by Krambeck et al [24] in the state of Santa Catarina, using PCR/RFLP for HPV typing, in 29 HPV+ women, and the second by Rosa et al [23] in the state of Rio Grande do Sul, using specific primers for typing HPV16, HPV18, and HPV31, in 179 HPV+ women, reported lower frequencies for HPV16 (17.2% and 18.6%, respectively) than the found here (28.0%). However, the second most frequent types identified in these studies (HPV53 with 10.3% and HPV31 with 15.8%, respectively) were found with higher frequencies than in our study (HPV53 with 3.0% and HPV31 with 3.8%). Furthermore, the HPV18 was not reported in state of Santa Catarina although this type has been found in the state of Rio Grande do Sul with lower frequency (3.3%) than the observed by us (14.4%).

Concerning the 84 HPV+ women with normal cytology, we found a higher frequency of HPV16 (28.6%; 24/84) and HPV18 (19.0%; 16/84) than in a meta-analysis, restricted to women with normal cytology, carried out for South America [7] with 15% and 5%, respectively. In addition, this meta-analysis found a frequency of 7% for HPV58, the second most frequent type, similarly to our sample (6.0%; 5/84) in which this type was the fourth most frequent. These data provide a complementary picture to studies of HPV type distribution in women with cancer or precancerous lesions.

Our results indicated a trend for a higher proportion of lesions in women infected by HR-types other than HPV16 and/or HPV18, indicating that other HR-HPVs must also be considered for further implement appropriate immunization and monitoring policies. Moreover, the considerable difference in frequency of HPV types amongst previous studies (e.g.: ranging from 17.2% to 78.7% for HPV16, and from 0% to 14.4% for HPV18,

among HPV+ women), evidences the need to further investigations to improve information of geographical distribution of HPV types in Brazil using standardized methodologies to HPV detection and typing.

Abbreviations

AGUS: Atypical glandular cells of undetermined significance; ASCUS: Atypical squamous cells of undetermined significance; HClI: Hybrid Capture II assay; HPV: Human Papillomavirus; HPV HR: Human Papillomavirus of High-Risk for cancer; HPV LR: Human Papillomavirus of Low-Risk for cancer; HSIL: High-grade squamous intraepithelial lesion; LSIL: Low-grade squamous intraepithelial lesion; PCR: Polymerase Chain Reaction; RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism

Acknowledgements

This study was supported by the Ministry of Health (Convênio INCA-FIOCRUZ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil, INCT-573806/2008-0); Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ, INCT-E26/170.026/20) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil). The authors express their gratitude to Vania Reis Girianelli and Luiz Claudio Santos Thuler for concession of samples and Fernanda Pedone Valdez and Hector N. Seuanez for manuscript revision.

Author details

¹Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. ²Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brazil. ³Genetics Division, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Integrated Service Technology in Cytology, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil.

Authors' contributions

MOS and CXL contributed to conception and design, acquisition, analysis and interpretation of data. CXL and MOS performed the molecular procedures, phylogenetic analyses, and drafted the manuscript. CRB revised the data and contributed with important intellectual content. MAMM and LMGZ conceived participated in study design and coordination, and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 10 September 2010 Accepted: 5 January 2011

Published: 5 January 2011

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM: **Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008.** *Int J Cancer* 2010, **127**:2893-2917.
2. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV: **The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer.** *J Clin Pathol* 2002, **55**:244-265.
3. zur Hausen H: **Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:342-350.
4. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, Snijders PJ, Peto J, Meijer CJ, Munoz N: **Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide.** *J Pathol* 1999, **189**:12-19.
5. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ: **Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer.** *N Engl J Med* 2003, **348**:518-527.
6. Smith JS, Lindsay L, Hoots B, Keys J, Franceschi S, Winer R, Clifford GM: **Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update.** *Int J Cancer* 2007, **121**:621-632.
7. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, Anh PT, Ferreccio C, Hieu NT, Matos E, et al: **Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis.** *Lancet* 2005, **366**:991-998.
8. de Sanjose S, Diaz M, Castellsague X, Clifford G, Bruni L, Munoz N, Bosch FX: **Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis.** *Lancet Infect Dis* 2007, **7**:453-459.
9. Harper DM, Franco EL, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuid A, Zahaf T, Innis B, Naud P, De Carvalho NS, et al: **Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial.** *Lancet* 2004, **364**:1757-1765.
10. Villa LL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, Wheeler CM, Koutsky LA, Malm C, Lehtinen M, et al: **Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial.** *Lancet Oncol* 2005, **6**:271-278.
11. Castellsague X, Menendez C, Loscertales MP, Kornegay JR, dos Santos F, Gomez-Olive FX, Lloveras B, Abarca N, Vaz N, Barreto A, et al: **Human papillomavirus genotypes in rural Mozambique.** *Lancet* 2001, **358**:1429-1430.
12. Naucler P, Da Costa FM, Ljungberg O, Bugalho A, Dillner J: **Human papillomavirus genotypes in cervical cancers in Mozambique.** *J Gen Virol* 2004, **85**:2189-2190.
13. Bao YP, Li N, Smith JS, Qiao YL: **Human papillomavirus type distribution in women from Asia: a meta-analysis.** *Int J Gynecol Cancer* 2008, **18**:71-79.
14. Camara GN, Cerqueira DM, Oliveira AP, Silva EO, Carvalho LG, Martins CR: **Prevalence of human papillomavirus types in women with pre-neoplastic and neoplastic cervical lesions in the Federal District of Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, **98**:879-883.
15. Lippman SA, Sucupira MC, Jones HE, Luppi CG, Palefsky J, van de Wijgert JH, Oliveira RL, Diaz RS: **Prevalence, distribution and correlates of endocervical human papillomavirus types in Brazilian women.** *Int J STD AIDS* 2010, **21**:105-109.
16. Fernandes JV, Meissner RV, Carvalho MG, Fernandes TA, Azevedo PR, Sobrinho JS, Prado JC, Villa LL: **Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil.** *BMC Res Notes* 2010, **3**:96.
17. Paesi S, Serafini EP, Barea F, Madi SR, Echeverrigaray S: **High prevalence of human papillomavirus type 58 in patients with cervical pre-malignant lesions in southern Brazil.** *J Med Virol* 2009, **81**:1270-1275.
18. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhaes AV: **Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2003, **98**:181-184.
19. Oliveira LH, Ferreira MD, Augusto EF, Melgaco FG, Santos LS, Cavalcanti SM, Rosa ML: **Human papillomavirus genotypes in asymptomatic young women from public schools in Rio de Janeiro, Brazil.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2010, **43**:4-8.
20. Baldez da Silva MF, Chagas BS, Guimaraes V, Katz LM, Felix PM, Miranda PM, Lima AA, Arraes LC, Martins DB, Lima Filho JL, et al: **HPV31 and HPV33 incidence in cervical samples from women in Recife, Brazil.** *Genet Mol Res* 2009, **8**:1437-1443.
21. Franco EL, Villa LL, Ruiz A, Costa MC: **Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types.** *J Infect Dis* 1995, **172**:756-763.
22. Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singer A, Santos LC, De Lucena Batista R, Lubambo T: **The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil).** *Int J Gynecol Cancer* 2000, **10**:143-150.
23. Rosa MI, Fachel JM, Rosa DD, Medeiros LR, Igansi CN, Bozzetti MC: **Persistence and clearance of human papillomavirus infection: a prospective cohort study.** *Am J Obstet Gynecol* 2008, **199**:617 e611-617.
24. Krambeck WM, Cadide RM, Dalmarco EM, de Cordova CM: **HPV detection and genotyping as an earlier approach in cervical cancer screening of the female genital tract.** *Clin Exp Obstet Gynecol* 2008, **35**:175-178.
25. Ayres AR, Azevedo e Silva G: **Cervical HPV infection in Brazil: systematic review.** *Rev Saude Publica* 2010, **44**:963-974.
26. Vernon SD, Unger ER, Williams D: **Comparison of human papillomavirus detection and typing by cycle sequencing, line blotting, and hybrid capture.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**:651-655.
27. Asato T, Maehama T, Nagai Y, Kanazawa K, Uezato H, Kariya K: **A large case-control study of cervical cancer risk associated with human**

- papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing-based genotyping. *J Infect Dis* 2004, **189**:1829-1832.
28. Lee SH, Vigliotti VS, Vigliotti JS, Pappu S: Validation of human papillomavirus genotyping by signature DNA sequence analysis. *BMC Clin Pathol* 2009, **9**:3.
 29. Moore RA, Ogilvie G, Fornika D, Moravan V, Brisson M, Amirabbasi-Beik M, Kollar A, Burgess T, Hsu R, Towers L, et al: Prevalence and type distribution of human papillomavirus in 5,000 British Columbia women—implications for vaccination. *Cancer Causes Control* 2009, **20**:1387-1396.
 30. Zandi K, Eghbali SS, Hamkar R, Ahmadi S, Ramedani E, Deilami I, Nejad HA, Farshadpour F, Rastian Z: Prevalence of various human papillomavirus (HPV) genotypes among women who subjected to routine Pap smear test in Bushehr city (south west of Iran) 2008-2009. *Virology* 2010, **7**:65.
 31. Girianelli VR, Santos Thuler LC: Evaluation of agreement between conventional and liquid-based cytology in cervical cancer early detection based on analysis of 2,091 smears: experience at the Brazilian National Cancer Institute. *Diagn Cytopathol* 2007, **35**:545-549.
 32. Girianelli VR, Thuler LC, Szklo M, Donato A, Zardo LM, Lozana JA, Almeida Neto OF, Carvalho AC, Matos JH, Figueiredo V: Comparison of human papillomavirus DNA tests, liquid-based cytology and conventional cytology for the early detection of cervix uteri cancer. *Eur J Cancer Prev* 2006, **15**:504-510.
 33. Girianelli VR, Thuler LC, Silva GA: Quality of cervical cancer data system in the state of Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. *Rev Saude Publica* 2009, **43**:580-588.
 34. Kurman RJ, Solomon D: *The Bethesda System for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses* New York; 1994.
 35. Manos MMT, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky SM: The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Cancer Cell Mol Diagnost Hum Cancer* 1989, **7**:209-214.
 36. de Roda Husman AM, Walboomers JM, van den Brule AJ, Meijer CJ, Snijders PJ: The use of general primers GP5 and GP6 elongated at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papillomavirus detection by PCR. *J Gen Virol* 1995, **76**:1057-1062.
 37. Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraive WM, Mendonca-Lima L, Alves-Ferreira M: ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 2008, **7**:861-871.
 38. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 2007, **24**:1596-1599.
 39. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H: Classification of papillomaviruses. *Virology* 2004, **324**:17-27.
 40. Weissenborn SJ, Hopfl R, Weber F, Smola H, Pfister HJ, Fuchs PG: High prevalence of a variety of epidermodysplasia verruciformis-associated human papillomaviruses in psoriatic skin of patients treated or not treated with PUVA. *J Invest Dermatol* 1999, **113**:122-126.
 41. Castle PE, Schiffman M, Burk RD, Wacholder S, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, Sherman ME, Lorincz A: Restricted cross-reactivity of hybrid capture 2 with nononcogenic human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, **11**:1394-1399.
 42. Castle PE, Solomon D, Wheeler CM, Gravitt PE, Wacholder S, Schiffman M: Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2. *J Clin Microbiol* 2008, **46**:2595-2604.
 43. de Cremoux P, Coste J, Sastre-Garau X, Thioux M, Bouillac C, Labbe S, Cartier I, Ziou M, Dosda A, Le Gales C, et al: Efficiency of the hybrid capture 2 HPV DNA test in cervical cancer screening. A study by the French Society of Clinical Cytology. *Am J Clin Pathol* 2003, **120**:492-499.
 44. Poljak M, Kocjan BJ, Kovanda A, Lunar MM, Lepej SZ, Planinic A, Seme K, Vince A: Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2 low-risk probe cocktail. *J Clin Microbiol* 2009, **47**:2611-2615.
 45. Poljak M, Marin IJ, Seme K, Vince A: Hybrid Capture II HPV Test detects at least 15 human papillomavirus genotypes not included in its current high-risk probe cocktail. *J Clin Virol* 2002, **25**:S89-97.

doi:10.1186/1743-422X-8-4

Cite this article as: Oliveira-Silva et al.: Human Papillomavirus in Brazilian women with and without cervical lesions. *Virology Journal* 2011 **8**:4.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Anexo 12. Distribuição dos estadiamentos dos casos de câncer de cabeça e pescoço e de orofaringe de acordo com a exposição ao HPV de alto ou baixo-risco.

	HPV baixo-risco		HPV alto-risco		<i>p</i> valor [§]
	N	%	N	%	
Câncer de CP					
Estádio precoce	4	57,1	3	42,9	0,06
Estádio avançado	0	0,0	14	100,0	
Câncer de Orofaringe					
Estádio precoce	2	50	2	50	0,08
Estádio avançado	0	0,0	9	100	

[§]Teste exato de Fisher.

Anexo 13. Distribuição dos graus de diferenciação dos tumores de cabeça e pescoço e de orofaringe de acordo com a exposição ao HPV de alto ou baixo-risco.

	HPV baixo-risco		HPV alto-risco		<i>p</i> valor [§]
	N	%	N	%	
Câncer de CP					
Diferenciado	1	14,3	6	85,7	0,53
Moderadamente diferenciado	2	18,2	9	81,8	
Pouco diferenciado	2	40,0	3	60,0	
Câncer de Orofaringe					
Diferenciado	0	0,0	3	100	0,55
Moderadamente diferenciado	1	16,7	5	83,3	
Pouco diferenciado	1	33,3	2	66,7	

O número de casos pode variar do total devido aos casos com dados não disponíveis.

[§]Teste de Qui-quadrado.

Anexo 14. Modelos preditores testados para o câncer de cabeça e pescoço.

Modelo 1.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,07	(1,05-1,09)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	5,09	(3,23-8,03)

Verossimilhança: 524,035; R²: 0,28. Log de

Modelo 2.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,07	(1,05-1,09)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,82	(1,73-4,67)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	6,59	(3,87-11,22)

Verossimilhança: 456,575; R²: 0,39. Log de

Modelo 3.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,08	(1,04-1,11)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,26	(1,05-4,87)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	9,14	(3,47-28,31)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	1,65	(0,47-5,84)
>21 g/dia de etanol	5,71	(2,18-14,97)

Log de Verossimilhança: 253,568; R²: 0,46.

Modelo 4.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,07	(0,05-1,09)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	3,10	(1,83-5,25)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	7,4	(4,10-13,37)
Etilismo		
Nunca etilista	1,0	
Ex ou atual etilista	0,75	(0,41-1,37)

Log de Verossimilhança: 455,688; R²: 0,40.

Modelo 5.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,05	(1,02-1,08)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,71	(1,32-5,58)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	15,78	(5,71-43,65)
Tempo de etilismo		
≤11 anos	1,0	
12-21	1,70	(0,57-5,06)
>21	4,87	(1,80-12,48)

Log de Verossimilhança: 277,120; R²: 0,45.

Modelo 6.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,05	(1,01-1,08)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,36	(1,00-1,55)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	1,03	(0,25-4,17)
>21 g/dia de etanol	3,68	(1,26-10,76)
Tempo de tabagismo		
≤25 anos	1,0	
>25 anos	5,16	(2,43-10,97)

Log de Verossimilhança: 211,879; R²: 0,35.

Modelo 7.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,08	(1,05-1,12)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	1,87	(0,84-4,41)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	1,80	(0,47-6,87)
>21 g/dia de etanol	7,67	(2,72-21,62)
Tempo de tabagismo		
≤25 anos	1,0	
>25 anos	11,89	(3,93-36,04)
Cor da pele		
Negra	1,0	
Multi-étnica	6,55	(2,36-18,22)
Branca	3,03	(1,17-7,85)

Log de Verossimilhança: 239,301; R²: 0,50.

Modelo 8.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,08	(1,04-1,12)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,33	(0,99-5,48)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	1,81	(0,46-7,14)
>21 g/dia de etanol	8,16	(2,74-24,26)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	13,06	(4,19-40,75)
Cor da pele		
Negra	1,0	
Multi-étnica	8,56	(2,94-24,91)
Branca	3,95	(1,46-10,65)
Grau de instrução		
Superior	1,0	
Ensino médio/ fundamental	7,37	(2,50-21,72)
Alfabetizado/ analfabeto	19,03	(3,37-107,58)

Log de Verossimilhança: 221,349; R²: 0,56.

Modelo 9.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,05	(1,01-1,10)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,34	(0,93-5,91)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	1,21	(0,30-5,48)
>21 g/dia de etanol	6,34	(2,03-21,04)
Nº de pacote-anos		
<25 pacotes/ano	1,0	
≥25 pacotes/ano	3,02	(1,43-6,38)
Cor da pele		
Negra	1,0	
Multi-étnica	8,29	(2,67-25,79)
Branca	3,72	(1,32-10,48)
Grau de instrução		
Superior	1,0	
Ensino médio/ fundamental	6,55	(2,12-20,23)
Alfabetizado/ analfabeto	14,45	(2,33-89,75)

Log de Verossimilhança: 191,492; R²: 0,44.

Modelo 10.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,08	(1,04-1,12)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,33	(0,99-5,48)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	1,72	(0,43-6,83)
>21 g/dia de etanol	7,22	(2,38-21,85)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	12,33	(3,94-38,61)
Cor da pele		
Negra	1,0	
Multi-étnica	8,17	(2,79-23,86)
Branca	3,73	(1,37-10,14)
Grau de instrução		
Superior	1,0	
Ensino médio/ fundamental	6,80	(2,28-20,29)
Alfabetizado/ analfabeto	19,47	(3,35-112,99)
Resultado para HPV		
Negativo	1,0	
Positivo	0,59	(0,24-1,45)

Log de Verossimilhança: 220,026; R²: 0,56.

Modelo 11.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,06	(0,98-1,14)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	5,58	(0,42-74,33)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	1,59	(0,093-27,5)
>21 g/dia de etanol	5,36	(0,54-53,1)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	4,27	(0,46-39,44)
Cor da pele		
Negra	1,0	
Multi-étnica	6,39	(0,49-83,05)
Branca	4,19	(0,39-44,87)
Grau de instrução		
Superior	1,0	
Ensino médio/ fundamental	2,76	(0,27-27,85)
Alfabetizado/ analfabeto	20,01	(0,37-1095,3)
Exposição por tipo de HPV		
Baixo-risco	1,0	
Alto-risco	2,21	(0,31-15,57)

Log de Verossimilhança: 40,238; R²: 0,47.

Modelo 12.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,08	(1,04-1,12)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,36	(1,00-5,57)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	1,78	(0,45-7,03)
>21 g/dia de etanol	8,00	(2,68-23,89)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	13,12	(4,20-40,97)
Cor da pele		
Negra	1,0	
Multi-étnica	1,98	(0,03-144,79)
Branca	3,89	(1,43-10,57)
Grau de instrução		
Superior	1,0	
Ensino médio/ fundamental	7,34	(2,48-21,72)
Alfabetizado/ analfabeto	18,57	(3,26-105,74)
Exposição por HPV16		
Negativo	1,0	
Positivo	0,78	(0,21-2,89)

Log de Verossimilhança: 221,118; R²: 0,56.

Anexo 15. Modelos preditores testados para o câncer de orofaringe.

Modelo 1.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,06	(1,04-1,09)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	8,81	(4,04-19,20)

Verossimilhança: 267,702; R²: 0,27. Log de

Modelo 2.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,06	(1,02-1,09)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	4,90	(2,20-10,91)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	9,23	(3,969-23,11)

Log de Verossimilhança: 233,794; R²: 0,39.

Modelo 3.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,07	(1,04-1,11)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	5,43	(2,36-12,39)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex-tabagista	5,96	(2,25-15,80)
Atual tabagista	21,96	(7,55-63,93)

Log de Verossimilhança: 222,485; R²: 0,43.

Modelo 4.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,0	(0,95-1,04)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	4,51	(1,78-11,43)
Tempo de tabagismo		
≤25 anos	1,0	
>25 anos	32,59	(6,93-153,25)

Log de Verossimilhança: 156,945; R²: 0,42.

Modelo 5.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,01	(0,97-1,05)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	4,17	(1,64-10,58)
Nº de pacote-anos		
<25 pacotes/ano	1,0	
≥25 pacotes/ano	13,40	(4,56-39,37)

Log de Verossimilhança: 163,318; R²: 0,38.

Modelo 6.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,08	(1,03-1,12)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,43	(0,85-6,92)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex-tabagista	3,59	(0,90-14,31)
Atual tabagista	13,70	(3,21-58,60)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	3,40	(0,30-38,85)
>21 g/dia de etanol	15,73	(1,90-130,36)

Log de Verossimilhança: 147,702; R²: 0,46.

Modelo 7.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,04	(0,99-1,09)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,96	(1,03-8,52)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex-tabagista	6,64	(1,78-24,80)
Atual tabagista	24,51	(5,83-103,02)
Tempo de etilismo		
≤11 anos	1,0	
12-21	0,36	(0,03-4,50)
>21	9,12	(1,81-45,92)

Log de Verossimilhança: 149,803; R²: 0,48.

Modelo 8.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,06	(1,01-1,10)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,34	(0,85-6,44)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	6,04	(1,64-22,30)
Carga etílica		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	4,02	(0,37-43,87)
>21 g/dia de etanol	15,45	(1,94-122,85)

Log de Verossimilhança: 156,066; R²: 0,41.

Modelo 9.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,02	(0,98-1,07)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,51	(0,92-6,82)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	10,43	(2,93-37,1)
Tempo de etilismo		
≤11 anos	1,0	
12-21	0,42	(0,35-5,11)
>21	9,54	(1,99-45,81)

Log de Verossimilhança: 157,627; R²: 0,44.

Modelo 10.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,06	(1,01-1,09)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	4,12	(1,23-13,84)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	6,82	(1,80-25,80)
Etilismo (carga etílica)		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	3,53	(0,31-40,07)
>21 g/dia de etanol	14,07	(1,72-115,08)
Grau de instrução		
Superior	1,0	
Ensino médio/ fundamental	10,34	(1,98-53,95)
Alfabetizado/ analfabeto	43,32	(4,77-393,59)

Log de Verossimilhança: 139,825; R²: 0,50.

Modelo 11.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,06	(1,02-1,10)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,79	(0,98-7,93)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	7,48	(1,97-28,36)
Etilismo (carga etílica)		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	4,12	(0,37-45,99)
>21 g/dia de etanol	17,50	(2,17-141,11)
Grau de instrução		
Fundamental/ Médio/ Superior	1,0	
Analfabeto/ alfabetizado	12,18	(2,33-63,82)

Log de Verossimilhança: 143,435; R²: 0,48.

Modelo 12.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,05	(1,00-1,10)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	3,23	(1,11-9,41)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	6,61	(1,73-25,23)
Tempo de etilismo		
≤11 anos	1,0	
12-21	0,39	(0,03-5,08)
>21	9,35	(1,77-49,45)
Grau de instrução		
Fundamental/ Médio/ Superior	1,0	
Analfabeto/ alfabetizado	7,87	(1,46-42,31)

Log de Verossimilhança: 142,361; R²: 0,52.

Modelo 13.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,05	(1,00-1,10)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	3,30	(1,13-9,58)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex-tabagista	6,57	(1,72-25,01)
Atual tabagista	26,98	(6,05-120,33)
Etilismo (tempo em anos)		
≤ 21 anos	1,0	
> 21 anos	14,40	(3,73-55,64)
Grau de instrução		
Fundamental/ Médio/ Superior	1,0	
Analfabeto/ alfabetizado	7,91	(1,48-42,35)

Log de Verossimilhança: 142,915; R²: 0,52.

Modelo 14.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,06	(1,01-1,10)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,41	(0,86-6,78)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	6,17	(1,66-22,96)
Etilismo (carga etílica)		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	4,03	(0,37-44,20)
>21 g/dia de etanol	16,09	(1,98-130,73)
Resultado para HPV		
Negativo	1,0	
Positivo	1,16	(0,42-3,22)

Log de Verossimilhança: 155,987; R²: 0,41.

Modelo 15.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,06	(1,01-1,10)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	0,98	(0,14-6,96)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	2,54	(0,36-18,08)
Etilismo (carga etílica)		
≤9 g/dia de etanol	1,0	
10-21 g/dia de etanol	3,57	(0,18-71,65)
>21 g/dia de etanol	4,09	(0,38-43,76)
Exposição por tipo de HPV		
Baixo-risco	1,0	
Alto-risco	2,96	(0,35-24,73)

Log de Verossimilhança: 36,90; R²: 0,23.

Modelo 16.

	Razões de Chances (IC 95%)	
Idade	1,0	(0,98-1,07)
Sexo		
Feminino	1,0	
Masculino	2,48	(0,91-6,78)
Tabagismo		
Nunca tabagista	1,0	
Ex ou atual tabagista	10,37	(2,91-36,93)
Etilismo (tempo em anos)		
≤ 21 anos	1,0	
> 21 anos	14,16	(3,89-51,56)
Exposição por HPV16		
Negativo	1,0	
Positivo	1,19	(0,30-4,62)

Log de Verossimilhança: 158,055; R²: 0,44.

Anexo 16. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade dos testes de hibridização *in situ* para DNA e RNA do HPV e expressão de p16INK4a por imunohistoquímica baseados na técnica padrão-ouro para detecção do HPV por PCR nos casos de câncer de cabeça e pescoço.

		PCR		Concordância (%)		Sensibilidade	Especificidade
		+	-	Geral	Kappa	%	%
ISH DNA	+	15	0	96,0	74,9	62,5	100,0
	-	9	203				
ISH RNA	+	7	0	92,5	42,4	29,2	100,0
	-	17	203				
IHQ p16INK4a	+	10	8	90,1	42,3	41,7	94,1
	-	14	191				

Anexo 17. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade dos testes de hibridização *in situ* para DNA e RNA do HPV e expressão de p16INK4a por imunohistoquímica baseados na técnica padrão-ouro para detecção do HPV por PCR nos casos de câncer da cavidade oral.

		PCR		Concordância (%)		Sensibilidade	Especificidade
		+	-	Geral	Kappa	%	%
ISH DNA	+	3	0	96,4	65,0	50,0	100,0
	-	3	77				
ISH RNA	+	0	0	-	-	0	100,0
	-	6	77				
IHQ p16INK4a	+	1	4	89,0	12,4	16,7	93,5
	-	5	72				

Anexo 18. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade dos testes de hibridização *in situ* para DNA e RNA do HPV e expressão de p16INK4a por imunohistoquímica baseados na técnica padrão-ouro para detecção do HPV por PCR nos casos de câncer de orofaringe.

		PCR		Concordância (%)		Sensibilidade	Especificidade
		+	-	Geral	Kappa	%	%
ISH DNA	+	9	0	94,3	78,6	69,2	100,0
	-	4	57				
ISH RNA	+	7	0	91,4	65,5	53,8	100,0
	-	6	57				
IHQ p16INK4a	+	9	2	91,4	69,9	69,2	96,5
	-	4	55				

Anexo 19. Análise de concordância, sensibilidade e especificidade dos testes de hibridização *in situ* para DNA e RNA do HPV e expressão de p16INK4a por imunohistoquímica baseados na técnica padrão-ouro para detecção do HPV por PCR nos casos de câncer de hipofaringe/ laringe.

		PCR		Concordância (%)		Sensibilidade	Especificidade
		+	-	Geral	Kappa	%	%
ISH DNA	+	3	0	97,3	73,7	60,0	100,0
	-	2	69				
ISH RNA	+	0	0	-	-	0	100,0
	-	5	69				
IHQ p16INK4a	+	0	2	90,1	-4,2	0	97,0
	-	5	64				