

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

FREQÜÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO
EM LESÕES EPITELIAIS DE BOCA

CARMEN MARIA LAZZARI

ORIENTADOR: Mary Clarisse Bozzetti
CO-ORIENTADOR: Onofre Francisco Quadros

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2002

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS
MÉDICAS

FREQÜÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO
EM LESÕES EPITELIAIS DE BOCA

CARMEN MARIA LAZZARI

ORIENTADOR: Mary Clarisse Bozzetti
CO-ORIENTADOR: Onofre Francisco Quadros

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

2002

L432f Lazzari, Carmen Maria

Freqüência de papilomavírus humano em lesões epiteliais de boca /
Carmen Maria Lazzari ; orient. Mary Clarisse Bozzetti ; co-orient.
Onofre Francisco Quadros. – 2002.
145 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do
Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Médicas. Porto Alegre – RS, 2002.

1. Papillomavírus humano 2. Infecções por papillomavírus :
Epidemiologia 3. Boca : Lesões I. Bozzetti, Mary Clarisse II. Quadros,
Onofre Francisco III. Título.

NLM: QW 165.5.P2

Catálogo Biblioteca FAMED/HCPA

À minha família e amigos,
obrigado pelo apoio e carinho e, desculpem-me a ausência.
Ao meu pai (*in memoriam*) o impulsionador de toda esta trajetória.

Agradeço à minha orientadora,
Mary Clarisse Bozzetti,
que acreditou nas minhas possibilidades e espero estar retribuindo com a
minha formação.

Ao meu co-orientador Onofre Francisco Quadros,
pelo seu apoio e incentivo. Admiro a ambos e tenho orgulho de tê-los ao meu
lado neste momento de crescimento intelectual.

AGRADECIMENTOS

A Luciano Krug pela orientação, auxílio e “ombro amigo” em todos os momentos de processamento das amostras.

A Cristiano Baldi que muito me auxiliou nas coleta das amostras e processamento do banco de dados.

Ao ambulatório de Estomatologia do HCPA e a toda equipe que lá atua, agradeço o apoio e convívio amigo no longo período de coleta das amostras em especial ao cirurgião dentista Eduardo Cirino.

Ao Serviço de Nefrologia do HCPA que possibilitou a realização do processamento das amostras em seu laboratório.

Agradeço o apoio financeiro recebido do **FIPE** – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e **FAPERGS** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS	8
INTRODUÇÃO	9
REVISÃO DE LITERATURA	12
1. ESTRATÉGIAS DE BUSCA BIBLIOGRÁFICA	12
2. EPIDEMIOLOGIA	14
2.1. Morbidade e Mortalidade	14
2.2. Fatores de Risco para o Câncer de Boca	18
3. A CARCINOGENESE E O PAPILOMAVÍRUS HUMANO	28
4. O PAPILOMAVÍRUS	34
5. HPV E A IMUNODEFICIÊNCIA	44
6. HPV E LESÕES ORAIS	46
7. DIAGNÓSTICO DE HPV	54
8. GENOTIPAGEM DO HPV POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA	59
9. LESÕES ORAIS MAIS COMUNS	61
OBJETIVOS	88
REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA	89
ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	101
VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO	119
ANEXOS	137

LISTA DE ABREVIATURAS

bp / pb – base pair – pares de base

CMV - citomegalovírus

DNA – ácido desoxirribonucléico

E – early – região precoce

EV – epidermodisplasia verruciforme

FEH – focal epithelial hyperplasia – hiperplasia epitelial focal

HPV – human papillomavirus - papilomavírus humano

HIV – vírus da imunodeficiência humana

HSV – vírus herpes simples

IC – intervalo de confiança

L – late – região tardia

LCR (URR) – long control region (upstream regulatory region) – região regulatória
longa

μL – microlitros

nm – nanômetros

OR – odds ratio

ORF – open reading frame – fase ou banda aberta de leitura

OSCC – oral squamous cell cancer - carcinoma de células escamosas oral

PBS – phosphate buffered saline – solução salina fosfatada

PCR – polymerase chain reaction - reação em cadeia da polimerase

PV – papilomavírus

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism - restrição enzimática de fragmentos de polimorfismos

RNA – ácido ribonucléico

RR – risco relativo

SM – salário mínimo

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Estimativas de incidência de Câncer de Boca	15
Quadro 2. Coeficientes brutos de mortalidade por Câncer de Boca	15
Quadro 3. Os tipos de HPV e as lesões clínicas associadas	30
Quadro 4. Comparação entre os Métodos de Diagnóstico Laboratorial	60
Tabela 1 – Coeficientes de Mortalidade, para Neoplasia Maligna do Lábio, Cavidade Oral e Faringe – Brasil	16
Tabela 2 - Coeficiente de Mortalidade, para Neoplasia Maligna do Lábio, Cavidade Oral e Faringe – Rio Grande do Sul	17
Tabela 3 - Coeficientes de Mortalidade, para Neoplasia Maligna do Lábio, Cavidade Oral e Faringe – Porto Alegre	17
Tabela 4 - Classificação dos tipos de HPV de acordo com a localização da Lesão	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa genômico do HPV 16	36
Figura 2. Funções atribuídas às bandas abertas de leitura do HPV	37
Figura 3. Condiloma Acuminado	62
Figura 4. Verruga Vulgar	64
Figura 5. Papiloma Oral	66
Figura 6. Hiperplasia Epitelial Focal	68
Figura 7. Líquen Plano Reticular	71
Figura 8. Líquen Plano Erosivo	72
Figura 9. Leucoplasia em ventre lingual	77
Figura 10. Leucoplasia em rebordo alveolar	77
Figura 11. Eritroplasia	79
Figura 12. Carcinoma Verrucoso	81
Figura 13. Carcinoma Labial	85
Figura 14 . Carcinoma Gengival	85
Figura 15. Carcinoma em rebordo alveolar	86
Figura 16. Carcinoma em língua	86

INTRODUÇÃO

Cerca de 3% dos novos cânceres em homens e mulheres são bucais⁽¹⁾. Destes, o câncer de células escamosas é a forma mais prevalente, sendo mais comum em homens e raramente ocorrendo antes dos 40 anos de idade. Já a incidência é bastante variada de região à região e as maiores taxas são descritas no sudeste asiático onde 30% de todos os cânceres ocorrem na região orofaríngea. Além disso, é relatada uma elevada mortalidade decorrente destas neoplasias que são responsáveis por cerca de 7% das mortes por câncer em homens e, 4% entre as mulheres. Entre os países europeus, a França apresenta a mais alta incidência de câncer orofaríngea, sendo aproximadamente 2 vezes maior que a taxa observada nos Estados Unidos da América do Norte⁽²⁻⁴⁾.

Múltiplos fatores estão envolvidos no desenvolvimento do carcinoma oral de células escamosas e entre eles estão o tabaco, o álcool, a irradiação, os vírus e os irritantes crônicos^(1, 3). Os agentes biológicos são fatores causais importantes e, entre eles, os virais têm capacidade para desenvolver vários tipos de doenças devido a sua complexidade e dificuldade terapêutica^(3, 5). As manifestações viróticas na cavidade bucal podem estar localizadas na língua, palato, mucosa bucal e lábios e, geralmente, são crescimentos exofíticos que aumentam com o decorrer do tempo, sendo frequentemente confluentes, podendo acometer áreas queratinizadas ou não⁽⁶⁾.

Entre os vírus que podem estar associados com este tipo de câncer estão os papilomavírus humanos (HPV) que são um grupo de vírus oncogênicos que têm sido implicados na gênese de vários tumores, particularmente tumores escamosos de cérvix, da região anogenital, da pele, dos trato digestivo e respiratório superior⁽²⁾. Nos últimos anos, estudos têm sugerido a associação entre infecções

por HPV e desenvolvimento de lesões pré-cancerosas e carcinoma de células escamosas^(7, 8).

O tratamento do câncer de boca é normalmente paliativo, já que o diagnóstico se dá, na maioria das vezes, em estágios tardios da doença. Além da elevada mortalidade em indivíduos que se encontram em faixas etárias economicamente ativas, o tratamento implica em mutilações que, muitas vezes, inabilitam o paciente para a reintegração familiar, social e profissional, temporária ou definitivamente.

O atraso no diagnóstico mostra ter como consequência, além do estágio avançado da doença, um aumento de custos no tratamento e hospitalizações por períodos mais longos.

Considerando que o processo de carcinogênese pode resultar da exposição a produtos químicos, a radiação e a vírus, alguns tipos de câncer tornam-se potencialmente preveníveis e, a prevenção e o diagnóstico precoce são atualmente as medidas mais efetivas de que dispomos para melhorar o prognóstico deste câncer⁽⁹⁾.

O diagnóstico precoce de tumores bucais não deveria apresentar grandes dificuldades, uma vez que os grupos de maior risco são bem conhecidos e a região é de fácil acesso ao exame clínico, dispensando qualquer tipo de equipamento especial, e lesões potencialmente cancerizáveis podem ser diagnosticadas e tratadas antes da transformação carcinomatosa. No entanto, os pacientes não são esclarecidos e negligenciam os sintomas, e os profissionais de saúde não examinam rotineiramente a mucosa bucal⁽⁹⁾.

A história natural da infecção oral por HPV não está totalmente clara, tampouco o papel que os fatores biológicos, químicos e físicos podem representar

em um processo que se desenvolverá em múltiplas etapas, e de onde nenhum dos fatores antes mencionados é suficiente para originá-lo^(10, 11).

Diante disto, este estudo propõe-se a verificar a frequência de HPV em lesões orais, nos pacientes que procuram o ambulatório de estomatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e, através da genotipagem deste vírus, identificar os portadores de tipos oncogênicos, para que seja mantido um controle adequado destes pacientes com vistas à transformação ou, descoberta de novas lesões.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. ESTRATÉGIAS DE BUSCA BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica foi elaborada inicialmente através de consulta ao banco de dados *Medline* via acesso a CD-room, em 1999, buscando artigos que relacionavam o Papilomavírus Humano à Lesões Oraais desde o ano de 1983.

O banco de dados *Medline* foi acessado através do site www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed, e o banco de dados *LILACS*, que contém as publicações latino-americanas indexadas também foi acessado para pesquisa. Estes bancos de dados foram acessados para pesquisa entre os anos 1985 e 2002 usando palavras-chave como: *HUMAN PAPILLOMAVIRUS, ORAL LESIONS, ORAL CANCER, POLYMERASE CHAIN REACTION, EPIDEMIOLOGY, RISK FACTORS*. Ao longo da revisão, outros artigos citados pelos diferentes autores que se tornaram de interesse foram consultados.

Outra pesquisa fez-se necessária a partir do momento em que o resultado da genotipagem mostrou tipos de HPV não comumente relatados. Assim, foram pesquisados no *Medline* relatos sobre o seqüenciamento parcial de HPV W13B (MM4) e HPV PAP238A (MM9).

Também foram compilados dados do Instituto Nacional do Câncer (INCa – <http://www.inca.gov.br>), Ministério da Saúde-Brasil, que apresentam estimativas de incidência e de óbitos por Câncer de Boca para o ano de 2002.

O Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM – <http://tabnet.datasus.gov.br>), Ministério da Saúde-Brasil, armazena dados de todo o Brasil sobre mortalidade. Deste banco foram retiradas as informações sobre mortalidade por Neoplasia Maligna do Lábio, Cavidade Oral e Faringe no período de 1996 a 1999 (sendo 1999 o ano que corresponde a última atualização publicada e disponível neste banco).

Além de alguns livros, teses publicadas foram consultadas com especial interesse. Todas as referências utilizadas para a elaboração desta revisão podem ser identificadas na relação bibliográfica.

2. EPIDEMIOLOGIA

2.1. Morbidade e mortalidade

As neoplasias de boca são definidas como neoplasias envolvendo a cavidade oral, a qual inicia nos lábios e termina no pilar anterior da garganta^(12, 13). Os tipos histológicos mais freqüentemente observados são os espinocelulares^(9, 12-14) seguidos pelos verrucosos, os indiferenciados, os de pequenas glândulas salivares, os sarcomas e, raramente, os melanomas malignos⁽⁹⁾.

O câncer de boca apresenta uma incidência extremamente variável. No entanto, este é considerado um importante problema de saúde pública em muitas partes do mundo^(9, 13), especialmente em países em desenvolvimento^(9, 15) e em áreas de alto risco, onde o hábito de mascar tabaco e betel¹ é popular⁽⁹⁾.

As neoplasias da cavidade oral e da faringe ocupam a 6ª posição no mundo entre os cânceres mais freqüentemente observados na população geral^(9, 12, 16, 17). Sendo que as maiores taxas, para o câncer bucal, são encontradas na França, Índia, Brasil e na Europa centro-oriental^(12, 15, 16). Na Índia, 56.000 novos casos de câncer de cavidade oral são identificados por ano totalizando 30% de todos os casos de câncer no país⁽²⁾. Também nos Estados Unidos, o câncer oral é considerado um importante problema de saúde, sendo responsável por mais de 6.000 mortes/ano⁽¹⁸⁻²⁰⁾. Neste país, a incidência deste câncer corresponde a 3-5% de todos os cânceres, e foi observado que esta aumentou em mais de 50% desde a década de 40 ao início da década de 80⁽¹⁸⁾.

No Brasil, o câncer de boca é a oitava neoplasia mais freqüente e são estimados 11.255 novos casos para o ano 2002, sendo 8.340 em homens e, 2.915

¹ Família das Piperáceas, Piper betle. Planta trepadeira tropical. Na Ásia, inclusive Indonésia, faz-se um preparado, que se mastiga, com as folhas e as sementes.

em mulheres⁽²¹⁾. Já no Estado do Rio Grande do Sul (RS), esta neoplasia encontra-se na 9ª posição sendo estimados 760 novos casos para este mesmo ano, onde 610 seriam homens e 150 mulheres⁽²¹⁾. Tanto no Brasil como no RS, a proporção de casos feminino/masculino esperada para o ano de 2002, para esta neoplasia é de 1 mulher para 3 a 4 homens, e na cidade de Porto Alegre, onde foi realizado o estudo, as estimativas de incidência, ajustada para idade, são maiores que a estimativa observada no país (quadro 1).

Quadro 1. Estimativas de incidência de Câncer de Boca para o ano 2002/100.000 habitantes estratificados por sexo

Neoplasia maligna de Boca	Brasil	Rio Grande Do Sul	Porto Alegre
Feminino	3,25	2,81	3,66
Masculino	9,69	11,90	12,95

fonte: INCa – Ministério da Saúde

Semelhante ao que ocorre na incidência, os coeficientes brutos de mortalidade para o câncer de boca também são maiores entre os homens do que entre as mulheres. Aqui também se observa que as estimativas para a cidade de Porto Alegre são maiores que as do RS e atingem quase o dobro das estimativas do Brasil, mais especificamente entre as mulheres⁽²¹⁾ (quadro 2).

Quadro 2. Coeficientes brutos de mortalidade por Câncer de Boca/100.000 habitantes, estimados para o ano 2002

Neoplasia maligna de Boca	Brasil	Rio Grande Do Sul	Porto Alegre
Feminino	0,78	1,02	1,33
Masculino	3,15	4,39	4,78

fonte: INCa – Ministério da Saúde

A tabela 1 descreve os coeficientes de mortalidade de acordo com a faixa etária e estratificados por sexo, para as neoplasias malignas de lábio, de cavidade oral e da faringe no período de 1996 a 1999 para o Brasil⁽²²⁾. Os coeficientes sugerem um pequeno aumento anual, em ambos os sexos, nas faixas etárias entre 50 e 69 anos e entre 70 a 80 anos ou mais. No entanto, observa-se uma diferença destes coeficientes quando compara-se a faixa etária dos mais idosos em relação às outras faixas etárias com indivíduos mais jovens. Este padrão se repete para o Rio Grande do Sul (tabela 2) e para a cidade de Porto Alegre (tabela 3).

Tabela 1 – Coeficientes de Mortalidade, para Neoplasia Maligna do Lábio, Cavidade Oral e Faringe / 100.000 habitantes em faixas etárias específicas - Brasil

ANO	SEXO	FAIXA ETÁRIA		
		30 – 49 anos	50 – 69 anos	70 – +80 anos
1996	Masculino	3,51	21,21	29,82
	Feminino	0,57	3,22	11,36
1997	Masculino	3,43	21,28	30,27
	Feminino	0,50	3,06	11,01
1998	Masculino	3,59	21,82	29,18
	Feminino	0,58	3,29	10,52
1999	Masculino	3,49	23,53	33,12
	Feminino	0,57	3,41	13,18

Fonte – SIM-DATASUS/MS – BRASIL

Tabela 2. Coeficiente de Mortalidade, para Neoplasia Maligna do Lábio, Cavidade Oral e Faringe/100.000 habitantes em faixas etárias específicas – Rio Grande do Sul

ANO	SEXO	FAIXA ETÁRIA		
		30 – 49 anos	50 – 69 anos	70 – +80 anos
1996	Masculino	4,56	29,43	31,36
	Feminino	0,56	2,26	8,63
1997	Masculino	3,91	25,62	27,78
	Feminino	0,34	4,32	10,24
1998	Masculino	4,37		32,02
	Feminino	0,39	29,60 3,59	8,03
1999	Masculino	4,97	31,45	35,54
	Feminino	0,88	-	10,05

Fonte – SIM-DATASUS/MS – BRASIL

Tabela 3. Coeficientes de Mortalidade, para Neoplasia Maligna do Lábio, Cavidade Oral e Faringe/100.000 habitantes em faixas etárias específicas – Porto Alegre (RS)

ANO	SEXO	FAIXA ETÁRIA		
		30 – 49 anos	50 – 69 anos	70 – +80 anos
1996	Masculino	9,55	57,56	7,46
	Feminino	1,90	2,66	14,71
1997	Masculino	10,60	50,01	65,10
	Feminino	0,47	9,70	17,04
1998	Masculino	10,54	87,04	55,47
	Feminino	1,87	11,39	19,36
1999	Masculino	8,27	79,99	55,13
	Feminino	1,39	6,09	16,84

Fonte – SIM-DATASUS/MS – BRASIL

2.2. Fatores de Risco para o Câncer de Boca

Diferenças na incidência e nos coeficientes de mortalidade observadas entre períodos e áreas geográficas são atribuídas a possíveis mudanças de exposição a fatores de risco para esta neoplasia⁽¹⁵⁾.

A boca, por sua localização e sua função, está continuamente em contato com diversos agentes químicos, físicos e biológicos. Estes agentes, atuando de forma isolada ou conjunta e pela exposição crônica, potencializam o risco para o desenvolvimento de câncer neste local⁽⁹⁾. Este câncer, parece ser induzido por uma combinação de fatores, entre eles, os hábitos pessoais, a atividade profissional e a região onde o indivíduo habita. Um dado que favorece esta hipótese é o fato de se observar que a incidência para este câncer tem acompanhado os padrões de consumo de tabaco e de álcool há várias décadas^(9, 13).

Outros fatores, além do tabaco e álcool^(15, 23), que são sugeridos como estando associados a esta neoplasia incluem vírus, imunidade, padrão sócio-econômico, dieta, dentição e predisposição genética^(13, 16, 18).

Fatores Demográficos

Nos países onde há relato de incidência do câncer de boca e de faringe é observado um aumento desta taxa com o aumento da idade da população. Em países do ocidente cerca de 98% dos casos ocorrem em indivíduos com idade superior a 40 anos⁽¹⁶⁾. Em regiões onde é descrita uma elevada prevalência, os casos ocorrem em idade mais precoce (em torno de 35 anos de idade), fato este atribuído a uma exposição elevada a várias formas de tabaco. Nesta áreas, mesmo na ausência de fatores de risco considerados tradicionais, como o álcool e o tabaco,

há relato da ocorrência freqüente de lesões com curso agressivo, em especial em indivíduos jovens e em idosos⁽¹⁶⁾.

A idade e o uso de tabaco e álcool são descritos como fatores de risco para o carcinoma oral de células escamosas^(15, 24). Entre 80 a 90 d% da ocorrência dos casos deste carcinoma tem sido sugerida a associação com o tabaco e com o consumo de bebidas alcoólicas, sendo que estes hábitos aumentam o risco desta neoplasia em 3 a 15 vezes quando comparados à população em geral⁽²⁴⁾. Alguns estudos sugerem que o câncer oral pode ocorrer até 15 anos antes em indivíduos que usam tabaco e álcool em relação aos que não são usuários destas substâncias⁽²⁵⁻²⁷⁾.

A incidência de câncer de boca e faringe tem sido, sistematicamente, maior em indivíduos do sexo masculino^(1, 16), sendo que em alguns países em desenvolvimento passa a ocupar a terceira posição em freqüência, ficando em 4º lugar entre as mulheres. A predominância de casos no sexo masculino também ocorre em países industrializados, onde os homens são afetados 2 a 3 vezes mais que as mulheres⁽¹⁶⁾.

O risco para o desenvolvimento do câncer de boca, assim como para outros cânceres, aumenta com a idade ocorrendo com maior freqüência em indivíduos com mais de 40 anos^(1, 16), atingindo um pico na 6ª e 7ª décadas⁽¹³⁾.

Em adultos na faixa etária de 18 a 45 anos, a freqüência do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço varia de 0,24% a 9%⁽²⁸⁾. Nesta faixa etária, estas neoplasias apresentam um comportamento mais agressivo porém a taxa de sobrevivência é semelhante à de outras faixas etárias⁽²⁸⁾. Hart e colaboradores⁽²⁸⁾ acreditam que esta malignidade, em faixa etária precoce, seja resultante da interação de fatores constitucionais e ambientais. Os fatores constitucionais estão ainda incompletamente delineados portanto, não passíveis de alteração. Porém,

quanto aos fatores ambientais, observaram um consumo elevado de tabaco e álcool. Acreditam que o combate ao tabagismo pesado e, ao consumo de álcool deve ser a meta de prevenção. Estes autores⁽²⁸⁾ estudaram uma população militar e relatam que entre militares americanos, na faixa etária de 18-25 anos, ocorre uma prevalência significativamente maior de tabagismo quando comparada à prevalência observada na população civil, seja em relação aos militares masculinos ou femininos.

O sexo masculino é 2 a 3 vezes mais afetado^(13, 16) que o feminino em países industrializados porém, em áreas de alta incidência, como na Índia, as taxas se aproximam ou são maiores no sexo feminino onde o hábito de mascar e fumar tabaco é comum entre as mulheres⁽¹⁶⁾.

As taxas de mortalidade parecem obedecer diferenças sócio-econômicas na população. Nos Estados Unidos da América do Norte (EUA), tanto a incidência como a mortalidade por cânceres relacionados ao uso de álcool e tabaco, são maiores em americanos descendentes de africanos do que em brancos⁽¹⁶⁾. Nos EUA também é descrita uma variação regional de até 5 vezes nas taxas de mortalidade e as justificativas para esta variação encontram-se nas diferenças étnicas, na situação sócio-econômica e, nas diferenças de exposição aos fatores de risco, incluindo o uso de tabaco oral sem fumaça no sul do país⁽¹⁶⁾.

Na Europa, são descritas variações geográficas quanto às taxas de mortalidade mostrando vários países (França, Hungria e República Tcheca) com altas taxas, sendo que, historicamente, estas têm sido associadas ao alto consumo de tabaco e álcool nestas comunidades⁽¹⁶⁾.

Também são descritas variações marcantes na incidência de câncer de pele e dos lábios de acordo com a latitude. Estes achados poderiam ser explicados pelo fato de que em áreas localizadas em altas latitudes os raios ultravioleta penetram

mais facilmente. Também a proximidade com o equador permite uma exposição à luz solar por um tempo maior contribuindo para uma maior incidência nestas áreas^(9, 16).

Traumatismo Crônico e Hábitos de Higiene Bucal

Alguns estudos^(9, 16) descrevem uma associação entre a área de irritação ocasionada pela prótese e a localização do tumor, no entanto, o papel desempenhado pela irritação crônica na carcinogênese não pode ser confirmado. Apesar disso, é descrita uma freqüência de próteses mal ajustadas e causadoras de dor significativamente maior em pacientes com câncer de boca⁽⁹⁾.

Outro fator de risco, descrito em estudo para verificar a relação entre fatores dentais e o câncer do trato aerodigestivo superior é a higiene bucal infreqüente^(15, 29, 30). No entanto, é importante salientar que o efeito da exposição a este fator pode ser confundida por fatores sócio-econômicos, tabagismo, abuso de álcool, bem como por fatores nutricionais⁽¹⁶⁾. É descrito que a incidência de câncer de boca aumenta com a piora do estado dentário e, que tabagistas e etilistas crônicos geralmente apresentam dentição inadequada, sendo que o risco de câncer pode ser até 8 vezes maior em indivíduos expostos a estas condições⁽⁹⁾.

Tabagismo

A suspeita de uma relação entre o tabagismo e câncer de boca remonta ao século XVIII. Os hábitos relacionados à exposição ativa ao tipo de tabaco variam nos diversos países, no entanto todas as formas de fumo estão ligadas à etiologia do carcinoma de células escamosas oral (OSCC)^(9, 12, 15, 16). Alguns exemplos desta variação são o hábito de mascar tabaco misturado com folhas de betel e cal ("pan"),

na Índia, ou de fumar cigarros manufacturados envoltos em folhas de ébano (“bidi”), ou mesmo de fumar “chutta” (espécie de cigarro fumado com a extremidade acesa dentro da boca, principalmente utilizado por mulheres pescadoras), também na Índia. Em algumas regiões da Itália, existe o hábito de fumar cigarros com a extremidade acesa dentro da boca. Já na região sudeste dos EUA, observa-se que algumas mulheres tem o costume de mascar fumo e usar rapé. Outros tipos de tabaco, como “hukka” e “chilum” (espécie de cachimbo de argila) são relatados em Bombaim, na Índia. O consumo de rapé e tabaco (“oral snuff”) parece ser, também comum na Suécia e associado a riscos elevados de OSCC⁽⁹⁾.

Em países industrializados, o fumo é responsável por 40-45% das mortes por todos os cânceres em homens; 90-95% das mortes por câncer de pulmão e, 85% de todas as mortes por câncer de boca naqueles com idade entre 35 e 69 anos⁽¹⁶⁾. O consumo de tabaco está relacionado ao acúmulo de dano do DNA celular. A exposição aos carcinógenos químicos do tabaco pode causar efeitos diretos ao DNA celular da cavidade oral humana no entanto, também têm sido detectados danos ao DNA genômico em vários outros tecidos de consumidores de cigarro^(9, 18). O fumo também reduz o número de células de Langerhans e, conseqüentemente, diminui a função destas células, as quais são responsáveis por uma ação antigênica essencial para a imunidade celular local^(29, 31).

Estudos relatam que 90% dos portadores de câncer de boca usam tabaco e, que o risco para o desenvolvimento de câncer nos fumantes é 4 a 10 vezes maior quando comparados a não fumantes⁽⁹⁾. Não foram observadas diferenças entre os vários estilos de consumo porém, estes estudos sugerem que o risco para câncer de boca em indivíduos que fumaram cigarros industrializados decresce progressivamente, atingindo, após 10 anos de abandono do hábito, o mesmo nível

verificado para os não-fumantes^(9, 15). Estes achados alertam para um importante papel causal do uso de tabaco na carcinogênese oral⁽⁹⁾.

O risco elevado de câncer de boca associado ao tabagismo é relatado por muitos autores^(9, 12, 15, 16). Há evidências indicando uma relação dose-resposta entre os carcinógenos encontrados nos cigarros e no álcool e o desenvolvimento do OSCC^(9, 19). Estudos sugerem que, no que diz respeito a associação com este câncer, ocorre uma ação sinérgica entre o fumo de cigarros e o álcool, a qual faz com que estes fatores atuem de forma multiplicadora e não apenas aditiva^(12, 15, 16). Esforços para entender os mecanismos de interação do álcool e tabaco, têm levado vários investigadores a analisar os riscos de desenvolvimento deste câncer, utilizando modelos de risco multiplicativo, modelos de risco aditivos e modelos que seguem um efeito intermediário entre aditivo e multiplicativo⁽¹⁵⁾. Johnson⁽¹⁶⁾ relata que o sinergismo entre álcool e tabaco é super-multiplicativo para o câncer de boca, aditivo para o de laringe e, entre aditivo e multiplicativo para o esôfago, conforme trabalho realizado por Franceschi e colaboradores⁽³²⁾.

Consumo de Álcool

O etanol puro nunca mostrou ser carcinogênico “in vitro” ou em estudos com animais^(15, 16, 25). Presume-se que este atue com outros agentes carcinógenos presentes nas bebidas e com carcinógenos ambientais, especialmente do tabaco^(16, 25). No entanto, um elevado risco para câncer do trato aerodigestivo superior associado ao álcool em não fumantes foi sugerido por alguns investigadores^(16, 33). Em relação ao câncer de boca, vários estudos têm sugerido um aumento no risco para o desenvolvimento desta neoplasia associado ao consumo de bebidas alcoólicas^(15, 16, 25). A associação descrita entre álcool e câncer de boca parece ser

independente do tipo de bebida consumida e o maior risco ocorre entre as categorias de maior consumo^(9, 15, 16).

Uma das muitas dificuldades em avaliar o papel do álcool tem sido a dificuldade em medir com precisão o consumo, considerando-se as variações na quantidade, nos tipos e nas concentrações alcoólicas⁽²⁵⁾. No entanto, embora o consumo de álcool tenda a ser subestimado pelo paciente, o aumento nas taxas de câncer bucal, no mundo ocidental, tem sido relacionado a um aumento no consumo do álcool nestas populações⁽¹⁶⁾. O mecanismo de ação carcinogênica do álcool não é conhecido, embora se especule sobre o possível efeito local pelo contato, a presença de carcinógenos diluídos, a ação sobre enzimas microssomiais que ativariam carcinógenos, sobre o dano celular pelo etanol e seus metabólitos e, também, como possível efeito sistêmico, as deficiências nutricionais, imunológicas e distúrbios da função hepática^(9, 15, 25). Quanto ao efeito sistêmico especula-se que como o álcool é rico em calorias, ele suprimiria o apetite levando à deficiências nutricionais que, por sua vez, também poderiam resultar de uma deficiência no metabolismo causada por doença hepática⁽¹⁶⁾. Como já mencionado previamente, o álcool pode agir potencializando de forma importante a capacidade que o fumo teria de induzir o câncer de boca confirmando assim um efeito sinérgico entre o álcool e o tabaco do tipo multiplicador e não aditivo^(9, 15, 16, 19).

Imunodeficiência

Pacientes que recebem terapia imunossupressora após transplantes de órgãos têm um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores malignos. A incidência de neoplasia nestes pacientes é 100 vezes maior que os controlados por idade⁽³⁴⁾. A causa para este aumento na incidência não é clara, mas pode ser devida à uma

possível combinação de fatores como a diminuição da detecção de células cancerígenas pelo sistema imune, a estimulação antigênica crônica pelo órgão transplantado, os efeitos carcinogênicos diretos de drogas imunossupressoras ou mesmo a proliferação de vírus oncogênicos^(34, 35).

Pacientes que tiveram um rim transplantado têm uma maior incidência de câncer de lábio, o que pode ser devido à imunossupressão⁽¹²⁾.

Infecções Virais

As evidências disponíveis até o conhecimento atual não são definitivas quanto a possibilidade de que algum tipo de vírus possa causar câncer de boca⁽⁹⁾. Cerca de 15% de todos os cânceres humanos podem ter relacionamento etiológico aos vírus⁽¹⁶⁾. O papilomavírus humano (HPV) e o vírus herpes simples (HSV) têm sido observados em elevados níveis no tecido tumoral do câncer de boca, embora o papel desses agentes ainda não esteja completamente claro⁽⁹⁾. Alguns tipos de HPV, considerados de alto risco, têm sido implicados como importante causa para o desenvolvimento de câncer do trato anogenital e poderiam estar envolvidos na etiologia do câncer de cavidade oral e faringe⁽¹⁵⁾. Evidências epidemiológicas e experimentais reforçam esta possibilidade, sendo que o aumentado risco de câncer na região da cavidade oral e faringe subsequente à ocorrência de câncer de cérvix sugere fator etiológico comum ao lado do tabaco⁽¹⁵⁾. Embora os HPV 16 e 18 sejam os tipos mais frequentes na cavidade oral, o envolvimento de outros HPV não podem ser descartados⁽¹⁵⁾. É sugerido que a infecção pelo HPV por si só não é suficiente para o desenvolvimento de neoplasia na cavidade oral⁽¹⁴⁾.

Parra e Slots⁽³⁶⁾ iniciaram um estudo investigando, através da PCR, 30 pacientes com periodontite e 26 com gengivite. Dos pacientes com periodontite, 78% tinham

pelo menos um dos 5 vírus pesquisados (60% Citomegalovírus(CMV), 30% Epstein Baar Vírus (EBV), 20% HSV, 17% HPV e 7% Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)), 40% apresentavam co-infecção(2 dos 5 vírus) e, em 31% das gengivites foi encontrado somente CMV. Anteriormente, pesquisas no sulco gengival estavam voltadas apenas para a detecção de bactérias fermentadoras e parasitas havendo pouca ou nenhuma consideração quanto à presença de vírus humano.

Fatores Nutricionais

A carência de certos nutrientes parece ser responsável por modificações da mucosa bucal, as quais poderiam predispor à uma transformação carcinomatosa. A deficiência de ferro e vitamina A ocasionam atrofia da mucosa e, predisõem não somente ao câncer de boca, mas também ao câncer da hipofaringe e do esôfago^(9, 15, 19). No entanto, em países tropicais a deficiência de ferro não se mostrou associada ao câncer de boca, sugerindo a possibilidade de que outras deficiências nutricionais possam estar implicadas⁽¹⁵⁾. Um decréscimo no risco para esta neoplasia foi relatado com o aumento no consumo de Vitamina A e C, frutas frescas, vegetais de folhas verdes e, cenoura, tomates frescos e pimentão verde⁽¹⁵⁾. Em estudo realizado no Brasil⁽³⁷⁾ foi sugerida uma proteção específica por frutas frescas independente de betacarotenos, vitamina C ou fibras contidas em frutas e vegetais^(15, 37).

Alguns experimentos têm sugerido que a vitamina A e seu precursor, o betacaroteno, possam reduzir lesões displásicas da mucosa oral^(9, 15). A vitamina A atuaria como inibidor sobre a ação dos carcinógenos químicos envolvidos na gênese de tumores epiteliais. Por sua vez, a carência dessa vitamina A poderia ocasionar alterações similares às provocadas por carcinógenos químicos. Alguns

investigadores observaram que o risco de câncer de boca em mulheres era inversamente proporcional ao consumo de frutas e verduras frescas e que um maior consumo de frutas cítricas e alimentos contendo vitamina C e betacarotenos resultava em um efeito protetor contra esse câncer^(9, 12, 16, 19, 28).

Aproximadamente 15% dos cânceres orais e de faringe podem ser atribuídos a uma dieta deficitária ou não balanceada os quais podem ser evitados com a aplicação dos conhecimentos de dieta relacionados a estes neoplasmas⁽¹⁵⁾.

História Familiar

O câncer de lábio está entre os sítios que mostram uma maior concentração de cânceres dentro de famílias em registros genealógicos de um banco de dados de Mormons do estado de Utah, EUA. Johnson⁽¹⁶⁾ cita um estudo realizado nos Países Baixos em que observaram um risco relativo (RR) de 3,5 ($p=0,0002$) para câncer de cabeça e pescoço entre parentes em 1º grau e, $RR=14,6$ ($p=0,0001$) para irmãos, independente de exposição ao fumo e ao álcool, sugerindo um componente constitucional. Outro estudo⁽¹⁶⁾ realizado nos EUA mostrou um elevado risco para câncer de orofaringe entre irmãs que desenvolveram outros cânceres, porém aqui o odds ratio (OR) foi de apenas 1,6 (intervalo de confiança de 95% - 1,1 – 2,2). Outros autores⁽²⁸⁾ acreditam que o aumento na prevalência de OSCC, observado em adultos jovens entre 18 e 45 anos possa resultar de uma interação sinérgica entre sensibilidade inata à mutações genéticas e exposição à carcinógenos.

Outros Fatores

A exposição a substâncias utilizadas nos processos industriais é responsável por 5% de todas as mortes por câncer. O risco para a população em geral é pequeno, visto que o número de indivíduos expostos é limitado. O processamento de metais, de fibras têxteis e couro, de níquel, álcool isopropílico e ácido sulfúrico como atividade profissional, leva a um aumento do risco de câncer de boca⁽⁹⁾. Indivíduos que trabalham ao ar livre têm risco aumentado de carcinoma de lábio possivelmente relacionado à exposição a luz ultravioleta^(9, 16). Além disso, parte das diferenças urbana e rural na incidência de carcinoma de cabeça e pescoço parecem estar relacionadas à exposição a poluição atmosférica⁽¹⁶⁾.

Em cozinhas equipadas com fogão a lenha foram encontrados altos níveis de compostos de hidrocarbono policíclico aromático, substâncias carcinogênicas, também presentes no tabaco. Isto reforça a condição do fogão a lenha como um fator que aumenta o risco dos cânceres de boca, faringe e laringe⁽⁹⁾.

O calor também tem sido apontado como um fator físico agressor da mucosa. A fumaça do cigarro, por exemplo, aumenta a temperatura na mucosa exposta a ela e, além disso somam-se aos efeitos químicos do tabaco⁽⁹⁾. O uso de cachimbo está relacionado a um aumento na incidência de câncer de lábio, achado possivelmente explicado pelo calor causado no local^(9, 16).

3. A CARCINOGENESE E O PAPILOMAVÍRUS HUMANO

A carcinogênese é o processo de transformação maligna em que ocorre o crescimento descontrolado de células causado pela mutação acidental de uma delas podendo haver a invasão de outros órgãos. É um processo ainda não bem

conhecido. Assim, o carcinógeno é o agente provocador ou estimulador do desenvolvimento de tumor maligno no organismo⁽⁹⁾.

A carcinogênese depende de vários fatores como a exposição a agentes ambientais (substâncias químicas, físicas, vírus), da capacidade individual geneticamente determinada de anular os carcinógenos (como um sistema enzimático antioxidativo eficiente), da modificação de sítios específicos do DNA (sendo que não é suficiente uma mutação qualquer), da habilidade com que a célula consegue reparar o DNA já modificado e da competência do hospedeiro no freio da progressão tumoral (sistema imune, fatores nutricionais, etc.)⁽⁹⁾.

O HPV é uma espécie viral antiga e está associado a processos de proliferação celular. Alguns dos tipos virais possuem oncoproteínas que podem inativar a função de proteínas celulares regulatórias do ciclo celular⁽¹⁰⁾ sendo considerados oncogênicos *in vivo*. Entretanto, infecções por HPV são comuns, e a maioria causa predominantemente lesões epiteliais benignas de pele, da mucosa oral, do trato urogenital, da laringe e possivelmente, dos brônquios e esôfago⁽³⁸⁾.

A diferença funcional entre HPV tipo alto e baixo risco relaciona-se fortemente com a conversão maligna de células infectadas^(38, 39). Os HPV de alto risco induzem a um aumento de anormalidades cromossomais, aneuploidias celulares e oncoproteínas codificadas (E5, E6 e E7) as quais interagem especificamente com proteínas celulares supressoras de tumores (p53, pRb), envolvidas na regulação do crescimento e proliferação celular estimulando a proliferação ou, interferindo na diferenciação das células infectadas^(10, 38, 39).

A expressão de oncoproteínas E6 e E7 de HPV de alto risco foram suficientes para aumentar a frequência de mutação em queratinócitos normais e, estes achados sugerem que a infecção viral em combinação com a existência de

carcinógenos químicos podem ser a causa suprema de indução de instabilidade genética e desenvolvimento de câncer oral^(18, 40).

Sabe-se que a infecção pelo HPV não é suficiente para a carcinogênese, uma vez que a progressão tumoral ocorre em pequena porcentagem de indivíduos infectados⁽³⁸⁾. Partículas maduras de HPV não podem ser detectadas em carcinomas, mas o DNA viral persiste, integrado ao DNA da célula hospedeira, e há expressão dos genes E6 e E7 do genoma do HPV. Como já mencionado previamente, são necessários anos, ou até mesmo décadas para que uma infecção pelo HPV se transforme em lesão maligna. A oncogenicidade do HPV é melhor caracterizada na região anogenital, onde está relacionada ao câncer de colo de útero. No câncer de colo de útero o HPV é observado em até 96% das lesões e tem se tornado modelo de oncogênese por este vírus⁽³⁸⁾.

Todos os tipos de epitélio escamoso podem ser infectados pelo HPV⁽⁴¹⁾. Cada um dos HPV é preferencialmente associado a uma diferente entidade clínico-patológica, embora vários tipos possam estar associados a uma mesma entidade⁽⁴²⁾. O quadro 3 descreve qual o quadro clínico associado a cada tipo de HPV.

Quadro 3. Os tipos de HPV e as lesões clínicas associadas ^(38, 42).

Tipos de HPV	Quadro Clínico Associado
1	Verruga plantar profunda e verrugas palmares
2	Verrugas vulgares, verrugas plantares em mosaico
3	Verrugas planas
4	Verrugas vulgares, verrugas plantares endofíticas
5	EV, CEC em EV
6	Verrugas anogenitais, papilomas laríngeos, tumor de Buschke-Löwenstein, NIC
7	Verruga de açougueiro
8	EV, CEC em EV
9	EV
10	Verrugas planas
11	Verrugas anogenitais, NIC, papilomas laríngeos
12	EV
13	Hiperplasia epitelial focal
14	EV, CEC em EV
15	EV
16	Verrugas anogenitais, NIC, NIV, NIP, carcinoma cervical

17	EV, CEC em EV
18	Verrugas genitais, NIC, carcinoma cervical
19	EV, CEC em EV
21-25	EV
26	Lesões cutâneas em imunodeprimidos
27	Verrugas vulgares
28	Verrugas planas e vulgares
29	Verrugas vulgares (raro)
30	Lesões anogenitais, carcinoma laríngeo
31	Verrugas anogenitais, NIC, carcinoma cervical
32	Hiperplasia epitelial focal, papilomas laríngeos
33	NIC, NIV, câncer cervical
34	Verrugas orogenitais, doença de Bowen cutânea
35	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
36-38	EV
39	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
40	Verrugas anogenitais, NIC, NIV, NIP
41	Verrugas planas, CEC
42,43	Verrugas anogenitais
44	Verrugas orogenitais
45	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
46	Reclassificado como HPV-20b, EV
47	EV, CEC em EV
48	Verrugas cutâneas (raro), CEC em imunodeprimido
49	EV, verrugas planas em imunodeprimido
50	EV
51	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
52, 53	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
54	Verrugas anogenitais, tumor de Buschke-Löwenstein(raro)
55	Verrugas orogenitais, papulose Bowenóide
56	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
57	Verrugas orogenitais, verrugas cutâneas
58	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
59	Verrugas orogenitais
60	Cisto plantar epidermóide
61, 62	NIV
63	Verrugas cutâneas (raro), verrugas plantares
64	Verrugas orogenitais, NIV
65	Verrugas planas pigmentadas
66-68	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
69	NIC
70	Verrugas anogenitais
72	Lesões cervicais
73	Verrugas anogenitais
75-77	Lesões cutâneas em imunodeprimidos

CEC = carcinoma espinocelular; EV = epidermodisplasia verruciforme; NIC = neoplasia intraepitelial cervical; NIP = neoplasia intraepitelial peniana; NIV = neoplasia intraepitelial vulvar.

Algumas lesões papilomatosas, hiperplásicas e verrucosas estão associadas ao HPV. Estas lesões proliferativas podem ocorrer em várias partes do corpo incluindo a região anogenital, laringe, cavidade oro-nasal, conjuntiva, outras mucosas e pele^(3, 5, 7, 8). Embora este vírus tenha sido o primeiro a ser relacionado

com neoplasias no homem, não há um conhecimento detalhado sobre o ciclo vital do vírus ou o antígeno viral pois, nenhum sistema de cultura “in vitro” está disponível para o papilomavírus humano^(5, 7, 8, 43).

Na cavidade bucal, as manifestações viróticas podem estar localizadas na língua, no palato, na mucosa bucal e nos lábios. Geralmente se apresentam sob forma de crescimentos exofíticos, que aumentam com o decorrer do tempo e são freqüentemente confluentes, podendo acometer áreas queratinizadas ou não⁽⁶⁾. Estas alterações mostram-se sob forma de epitélio hiperqueratinizado representado clinicamente como uma lesão branca ou, se mais complexas, com áreas eritematosas ou ulcerativas⁽¹⁹⁾.

De uma maneira geral, há tipos de HPV muito semelhantes, enquanto outros são muito distintos em sua seqüência de nucleotídeos. No entanto, as considerações sobre a homologia de seus genomas, que freqüentemente permitem a classificação de HPV por grupos, não é suficiente para tecer considerações clínicas. Sendo assim, diferenças biológicas importantes podem resultar de variações muito discretas em certas porções do genoma; ao mesmo tempo, grandes variações em outras regiões gênicas podem ser destituídas de qualquer propriedade patogênica⁽³⁸⁾.

Estudos epidemiológicos sistemáticos relacionados ao HPV têm mostrado que as seqüências de tipos do HPV que são isoladas em diferentes partes do mundo são marcadamente bem conservadas. Não somente os tipos clássicos de HPV, os quais causam condições como o papiloma e os condilomas, mas também os tipos de HPV que infectam pacientes com epidermodisplasia verruciforme (EV), a qual é uma manifestação rara, são encontrados mundialmente. Estes achados sugerem que haja um reservatório de indivíduos que abrigam HPV do tipo que atinge a EV e que a infecção latente por vários tipos de HPV é comum. Estes estudos

também têm mostrado que novos tipos de HPV continuam a ser descobertos, muitos dos quais em pacientes de regiões geograficamente isoladas. Conclui-se que o HPV é diverso e onipresente. Este tipo de diversidade genética é única entre os vírus DNA que infectam o homem⁽⁴⁴⁾.

Em relação a lesões orais, parece não haver uma associação preferencial demonstrada entre HPV tipo específico e uma lesão oral em particular^(45, 46). Tem sido observado o envolvimento do HPV em uma variedade de lesões benignas orais⁽⁴⁷⁾. Além disso, um possível papel etiológico da infecção por HPV na patogênese de lesões pré-cancerosas e câncer ou, um significativo fator no desenvolvimento da tumorigênese tem sido sugerido após a descoberta de diferentes tipos de HPV-DNA nestas lesões^(2, 7, 40, 46, 48-50).

Como o HPV tem sido encontrado também em mucosa oral normal, em especial em mucosa oral saudável de adultos e em crianças de pré-escola, onde prevalência deste é elevada⁽⁵¹⁾, ainda não está claro se o HPV detectado em carcinoma de células escamosas oral é causalmente associado com o desenvolvimento do tumor ou somente uma infecção passageira⁽⁵²⁾. O DNA de vários tipos de HPV pode infectar o epitélio oral em baixos níveis e não necessariamente resultar em patologia clínica ou histológica⁽²⁹⁾. O HPV é considerado um vírus persistente podendo permanecer inativo em células do hospedeiro por extensos períodos de tempo. Geralmente são necessários anos ou mesmo décadas para que uma infecção por HPV transforme-se em uma lesão maligna^(53, 54). E, embora caracterizados por um baixo grau de patogenicidade, seus efeitos sinérgicos com outros carcinógenos, como tabaco e álcool, podem intensificar o potencial carcinogênico de genótipos específicos do DNA do HPV^(54, 55). Também tem sido hipotetizado que a replicação viral pode ser ativada por fatores como trauma e outros agentes microbianos e que o epitélio oral atuaria

como reservatório para o HPV⁽⁴⁷⁾. Fatores restritos ao hospedeiro, como hormônios, resposta imune e herança genética, parecem ser capazes de desencadear a progressão tumoral a partir de uma infecção por HPV⁽⁵⁴⁾.

A infecção pode ser clínica, subclínica ou latente^(44, 56), sendo transmissível nos dois primeiros modos, através de contato sexual, de contato pele à pele, de auto-inoculação, por fômites contaminados e mesmo durante o parto, da mãe para o filho. A predisposição genética também é apontada como um possível fator que contribuiria para o desenvolvimento desta infecção⁽⁵⁷⁾.

4. O PAPILOMAVÍRUS

Características do vírus

O papilomavírus (PV) pertence à família dos Papovavírus ou Papovaviridae. Esta é uma grande família de vírus DNA constituída por dois gêneros: o gênero A, que compreende os papiloma vírus, e o gênero B que compreende o polioma vírus e o SV-40 (“Simian Vacuolating Virus” = vírus vacuolizante do macaco). Estes vírus são epiteliotrópicos, ou seja, têm especial afinidade por células epiteliais. Além disso, são alguns dos menores vírus DNA conhecidos (55 nm de diâmetro), e seu genoma se caracteriza por uma hélice dupla de ácido desoxirribonucléico tendo como sítio de multiplicação o núcleo celular. Estes possuem aproximadamente 8000 pares de bases e têm um peso molecular de $5,2 \times 10^6$ dáltons. Os papilomavírus não têm invólucro e possuem capsídeos icosaédricos constituídos por 72 capsômeros que circundam o genoma^(20, 39, 42-44, 58, 59). São vírus comuns na natureza e têm sido reconhecidos primariamente em vertebrados maiores⁽⁵⁹⁾. A organização genômica de todos os tipos de HPV é semelhante havendo diferenças na seqüência

de nucleotídeos do DNA. O genoma viral está organizado em 3 segmentos de tamanho desigual (sendo dois codificantes), consistindo de uma região precoce (chamada E de “Early”), uma região tardia (chamada L de “Late”) e uma região de controle longo (ou regulatória, chamada de LCR ou URR de “Upstream Regulatory Region”). A região não-codificante é a LCR e está localizada entre o final da região L e o início da região E, estando envolvida com a replicação viral, a qual ocorre exclusivamente no núcleo da célula do hospedeiro^(44, 60) e, com o controle da expressão dos genes virais. Cerca de 10% do genoma está contido dentro desta região e o restante está contido na região precoce (E - 50%) e, na região tardia (L - 40%)⁽³⁹⁾.

Há dois modos de replicação dos papilomavírus. O primeiro ocorre nas células da camada basal da epiderme, onde o genoma viral é mantido de forma estável em cópias múltiplas, sendo distribuído homoganeamente entre as células-filha. Este tipo de replicação garante uma infecção persistente das células proliferativas da camada basal. Uma outra forma de replicação do DNA viral é a vegetativa, que ocorre nas camadas mais diferenciadas da epiderme. Tais genomas virais, em múltiplas cópias, são finalmente montados em partículas virais maduras ou vírions, sendo que uma das características da semelhança na organização genômica é que todos os genes virais, ou unidades de tradução (chamadas ORF de “Open Reading Frames” ou bandas abertas de leitura), estão localizados na mesma fita de DNA, onde as seqüências são designadas de E1 a E8 e de L1 a L2 (Fig. 1)^(61, 62).

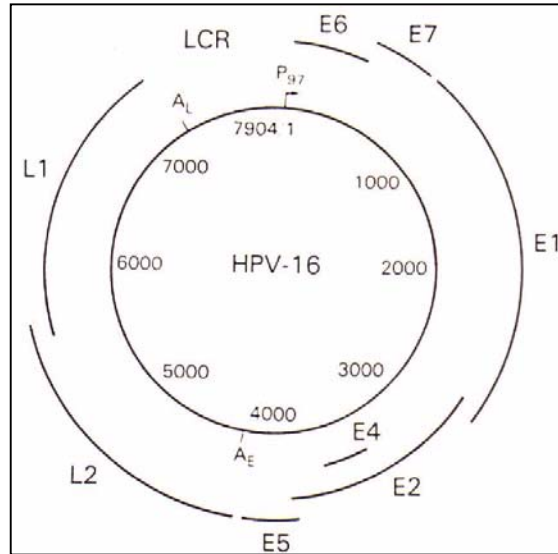


Fig.1 – Mapa genômico do HPV 16 determinado a partir da seqüência de DNA. O genoma é uma molécula de DNA com dupla alça circular contendo 7.904 pares de bases. A transcrição ocorre em sentido horário; o único promotor transcripcional mapeado até o presente para o HPV 16 é o P97. As ORFs da seqüência de DNA são designadas de E1 a E7 e de L1 e L2 e estão demonstrados no lado externo do genoma circular. AE e AL representam a região precoce e a região tardia respectivamente. A região longa de controle viral (LCR) contém elementos regulatórios transcripcionais e de replicação.

Os genes precoces estão envolvidos na replicação do DNA viral (E1), no controle da transcrição (E2), na maturação e liberação das partículas virais e alteração da matriz celular (E4) e no estímulo de proliferação e transformação celular – imortalização (E5, E6 e E7). As proteínas codificadas por E6 e E7 de tipos oncogênicos de HPV têm mostrado capacidade de desregular o ciclo celular, por se unirem aos produtos de genes supressores de tumores (p53 e Rb) envolvidos na regulação do crescimento e proliferação celular⁽⁶⁰⁾. A região tardia compreende os genes L1 e L2, que representam as proteínas principal e secundária do capsídeo e têm a função de codificarem as proteínas estruturais do capsídeo viral^(20, 44, 60, 61) (Fig.2).

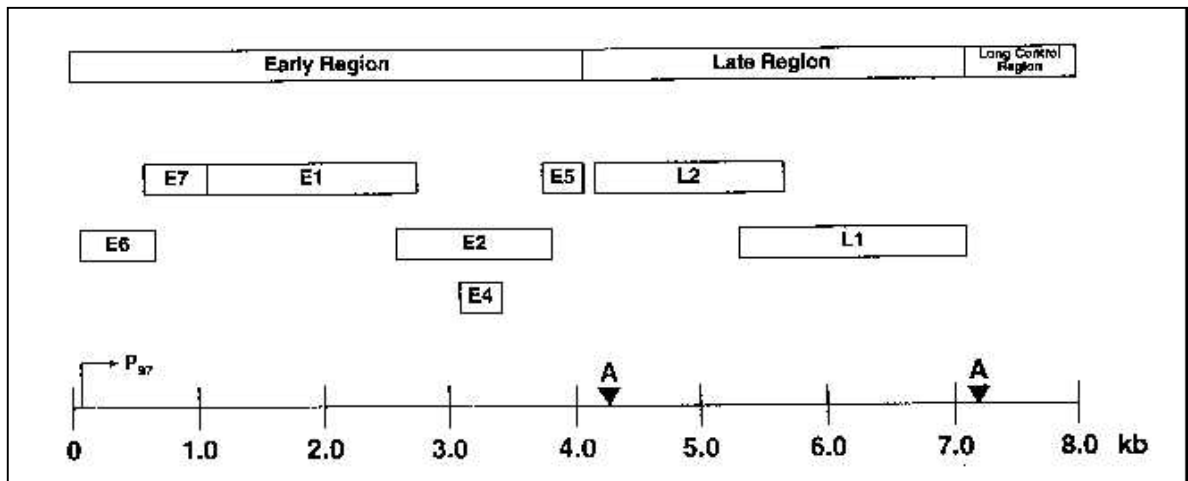


Fig.2 - Funções atribuídas às bandas abertas de leitura do HPV⁽⁶¹⁾

FUNÇÃO	ORF
Replicação do DNA viral	E1
Controle da transcrição	E2
Estímulo de proliferação e transformação celular	E5, E6, E7
Proteína principal e secundária do capsídeo	L1, L2
Maturação do vírus e alteração da matriz celular	E4
Ignorada	E3, E8

Classificação do PV

Todas as papilomatoses virais humanas e animais pertencem ao gênero Papillomavirus o qual constitui um dos dois gêneros da família Papovaviridae. Os papilomavírus apresentam um extremo grau de especificidade ao hospedeiro e, embora haja uma falta de evidência que humanos possam ser infectados por algum papilomavírus animal, existe a sugestão de que o papilomavírus canino possa ser transmitido ao homem^(5, 7, 63). A transmissão natural inter-espécies não está descrita, com exceção da papilomavírose bovina que pode infectar cavalos⁽⁶⁴⁾.

Papilomavírus têm sido isolados de pelo menos 24 espécies animais incluindo aves, répteis e mamíferos^(5, 7) (infectam a mucosa epitelial ou superfície

cutânea de quase todas as espécies vertebradas) e, em algumas destas espécies têm sido associado ao carcinoma invasivo⁽⁶⁵⁾.

A observação de que infecções por papilomavírus em cauda de coelho levavam ao desenvolvimento de lesões queratinosas, e de que algumas progrediam para neoplasmas epiteliais invasivos, em 1933, levou à descoberta do primeiro vírus DNA causador de tumores em mamíferos⁽³⁹⁾. O Papilomavírus é classificado de acordo com a seqüência de ácidos nucléicos, com os componentes do genoma e com o hospedeiro infectado^(5, 7).

As papilomaviroses podem produzir proliferação epitelial pura, sendo, um exemplo, os papilomas observados em todos os tipos humanos e em alguns tipos bovinos. Além disso, pode haver uma combinação de proliferação epitelial e fibroblástica, que são os fibroblastomas observados em alguns tipos bovinos e ovinos. O aspecto histológico se caracteriza por um espessamento da epiderme (acantose) e por hiperkeratose, sendo que comumente se observa algum grau de papilomatose. A presença de grânulos cerato-hialinos proeminentes na camada granular do epitélio é, muitas vezes, observada^(20, 59).

Todos os papilomavírus partilham algumas seqüências de nucleotídeos. Nos genomas virais, as áreas mais conservadas incluem a região E1, E2 e a L1, sendo as áreas menos conservadas as regiões regulatória de controle longo, a E4, E5 e a L2⁽⁶²⁾.

Os papilomavírus diferem de muitos outros vírus DNA em que, depois de infectar o hospedeiro, o genoma do papilomavírus não é normalmente inserido dentro do genoma do hospedeiro. O genoma existe como um epissoma, ou seja, uma hélice circular com somente uma banda transcricionalmente ativa⁽⁶²⁾

O papilomavírus que infecta o homem recebe a denominação de papilomavírus humano (HPV) ^(5, 7). A especificidade tecidual do HPV parece ser exclusiva para o epitélio pavimentoso da pele e para as mucosas⁽⁴⁴⁾. Estes vírus são transmitidos em fases precoces da vida humana^(1, 5, 41), sendo que podem ser subclassificados em tipos quando isolados dentro da mesma espécie^(5, 7).

A distinção entre tipos de papilomavírus é baseada na homologia existente entre a seqüência de nucleotídeos de seus genomas. Um HPV é considerado um novo tipo se a seqüência de nucleotídeos dos genes L1, E6 e E7 (aproximadamente 30% do genoma viral) diferir em mais de 10% dos tipos conhecidos. Se estas diferenças forem menores de 2%, designam-se como “variantes” do mesmo tipo, ou, ainda, se a diferença estiver entre 2 e 10%, os HPV isolados são classificados como “subtipos” virais^(20, 44, 66). Atualmente, considera-se que uma diferença superior a 10% na seqüência de nucleotídeos do gene L1 é critério suficiente para definir um novo tipo^(65, 67).

São conhecidos mais de 120 tipos de HPV, sendo que 80 deles já estão bem caracterizados em humanos^(1, 5, 7, 44, 68) e destes, 16 são mais frequentemente observados em lesões bucais (1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35 e 57). A maioria são de baixo risco (6, 11, 13, 32), associados a lesões benignas da cavidade bucal, e com potencial pequeno para a progressão maligna. Os genótipos de alto risco (16, 18, 31, 33, 35) têm um potencial maligno aumentado e são freqüentemente associados à displasia epitelial e carcinoma de células escamosas⁽¹⁾.

Os genótipos 13 e 32 são exclusivos de lesões da cavidade bucal, comumente vistos em hiperplasia epitelial focal (FEH) e em uma pequena percentagem de condiloma acuminado e papiloma de células escamosas^(7, 46, 49). Em

papilomas orais, o HPV 6 e 11 são os mais freqüentemente observados; em verrugas orais o HPV 2 e 4 foram identificados e, em lesões pré-cancerosas e câncer os tipos de HPV 2, 11, 16 e 18 foram observados, sendo o HPV 16 o tipo mais freqüente⁽³⁾.

A variabilidade intra-genômica tem sido estudada nos HPV tipo 5, 6, 8, 11, 16, 18 e 45. Ela ocorre em torno de 2% em regiões codificadas e, 5% em regiões não codificadas. Em geral, estima-se que o papilomavírus DNA genoma evolua em taxas de aproximadamente 1% por 100.000 anos, o que é muito menor que a observada entre vírus RNA. Estes achados têm levado alguns investigadores a sugerirem que todos os tipos de HPV conhecidos são extremamente estáveis e têm existido em forma quase idêntica desde o começo da espécie humana^(47, 65, 69).

Classicamente, o HPV tem sido classificado de acordo com a localização das lesões nas quais foi inicialmente isolado^(65, 70). Desta forma, foram definidos 3 grandes grupos de HPV que são os tipos cutâneos, os tipos mucosos ou genitais, os quais infectam também mucosas orais e respiratórias, e os tipos cutâneos associados à EV⁽⁷⁰⁾ (tabela 4). Esta classificação não é rigorosamente correta, uma vez que tipos genitais de HPV são eventualmente encontrados na pele, e vice-versa⁽³⁸⁾.

Os tipos mucosos têm sido subdivididos em alto e baixo risco, ou seja, com ou sem potencial oncogênico⁽⁷¹⁾. Análises filogenéticas têm sido utilizadas na tentativa de encontrar um outro sistema de classificação para o HPV^(67, 70).

Tabela 4. Classificação dos tipos de HPV de acordo com a localização da lesão que causam com maior frequência

Localização	Tipos de HPV
Cutânea	1, 4, 41, 48, 60, 63, 65
Mucosa	6, 11, 13, 16, 18, 26, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 73
Cutânea e/ou mucosa	2, 3, 7, 10, 27, 28, 29, 40, 43, 57, 61, 62, 72
Cutânea associada à Epidermodisplasia Verruciforme	5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20/46*, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 49, 50

-
- HPV 46 é um subtipo do HPV 20; Tabela Modificada de Wieland & Pfister, 1999.⁽⁷²⁾

Transmissão

O modo de transmissão viral não é claro. Há evidências de que a infecção laringeal por HPV nas crianças pode originar-se no parto de uma infecção cervical da mãe, ou através de aspiração neonatal de líquido amniótico durante o parto, ou por transmissão via hematogênica durante viremia. Esta última hipótese é a mais aceita para explicar a transmissão materno-fetal^(20, 58, 73). Chatterjee e colaboradores⁽⁷³⁾ promoveram um estudo por hibridização *in situ* pesquisando HPV DNA com sondas para tipos 6/11, 16/18 e 31/33/35 em 30 gestantes, com 20 a 34 anos de idade, 24 horas antes do parto, com coleta de raspado cervical e, coleta de *swab* bucal em seus bebês, 24 horas após nascimento, sendo 12 meninas e 19

meninos. Das gestantes, 21 sofreram parto normal e 9 foram submetidas à cesárea. Foram HPV positiva 12 das 30 gestantes (40%) e 5 de seus bebês (5/12; 41,6%). Destes bebês, 2 nasceram de partos normais e, 3 nasceram de partos cirúrgicos. O tipo mais freqüente nas mães foi o HPV 16/18 (5/30; 16,6%) e, nos bebês foi o HPV 6/11 e 16/18 em taxas iguais (6,4%). As possibilidades de transmissão de HPV de mãe para filho incluem a rota intra-parto (durante passagem pelo canal de nascimento infectado), transplacentária (intra-útero) e, pós-natal no contato com indivíduos infectados. A transmissão ocorre mais freqüentemente quando células cervicais de mães contêm alta carga viral. A taxa de positividade para HPV em mulheres assintomáticas varia de 1,3% a 40%. Durante a gravidez esta taxa pode aumentar para 52%. O aumento na prevalência de HPV tem sido demonstrado com a progressão da idade gestacional. A alta taxa de HPV positivo no raspado cervical coletado na segunda metade da gestação tem sido atribuída a influências hormonais. A influência de hormônios nos elementos regulatórios do HPV tem sido demonstrada experimentalmente⁽⁷³⁾. A possibilidade de flutuação na detecção do HPV DNA durante o curso gestacional também tem sido sugerido. Então, uma alta atividade hormonal em estágio avançado da gestação pode contar com alta prevalência de HPV.

A influência hormonal e o estado alterado de imunidade, da mulher próximo ao parto, pode levar a um aumento na ativação de HPV latentes e então resultar em um alto nível de detecção de HPV em amostras cervicais. O número de bebês com HPV positivo nascidos por cesárea indica que este modo de parto não tem efeito protetor para a transmissão vertical do HPV. E a ausência de baixa taxa de transmissão de algum HPV tipo específico pode refletir a presença de pequeno número de cópias por célula e/ou menos carga viral nas mães. A seqüência de HPV DNA tem sido detectada em fluido amniótico de gestantes que tiveram doença

cervical associada. Isto indica que o HPV tem a capacidade de cruzar a barreira placentária sendo possível a transmissão materno-fetal. O feto então pode ter contato com a infecção por HPV antes do parto.

Entretanto, o modo de transmissão mais comum é horizontal.

O contágio da infecção pelo HPV ocorre por contato direto ou indireto, através de fragmentos de tecido infectado que penetram no organismo humano por meio de soluções de continuidade. A auto-inoculação também pode ocorrer quando estes fragmentos infectados derivam da própria pessoa. Além disso, admite-se a possibilidade de transmissão da infecção pelo HPV através de fômites e até mesmo pelo solo^(38, 43, 58, 74, 75).

Patogênese

A inoculação bem sucedida do HPV depende da susceptibilidade individual e da viabilidade do vírus. Os fatores que podem influenciar a infectividade são o grau de exposição das lesões, o número de partículas virais na lesão e os mecanismos de defesa específicos do hospedeiro. A imunidade mediada por células é mais importante que a humoral na resposta do hospedeiro ao HPV^(38, 43).

O HPV penetra nas células da camada basal expostas após micro-traumatismos, sendo que os vírions perdem o seu invólucro protéico e o genoma viral alcança o núcleo onde se estabelece em forma epissomal^(20, 43, 65, 75). As células basais infectadas experimentam um retardo na sua diferenciação e se dividem lateralmente produzindo um clone de células basais infectadas^(20, 65). As células basais não permitem sua replicação, no entanto, com a diferenciação dos queratinócitos, a replicação viral e a síntese de proteínas estruturais do HPV têm início nas camadas superiores do epitélio. Os eventos celulares específicos

relacionados com a diferenciação celular traduzem sinais estimulatórios para a replicação viral⁽⁶⁵⁾. Partículas virais maduras podem ser detectadas nos núcleos das células da camada granulosa ou córnea^(38, 44). O HPV se replica em grande número somente em células altamente diferenciadas⁽⁶⁵⁾.

Incubação e Latência

O período de incubação do HPV varia de 6 semanas a 8 meses⁽⁶⁵⁾. No entanto, pouco se sabe sobre a latência deste vírus^(43, 76). Após o período de latência inicia-se uma fase ativa de expressão do vírus, em células permissivas (maduras) e na presença de fatores predisponentes relacionados ao hospedeiro, ao tipo de HPV e à presença de co-fatores⁽⁴³⁾. Certamente, a latência é possível e é provavelmente relacionada a uma resposta imune que pode conter a infecção (regressão) ou ser insuficiente para eliminá-la (expressão ativa)⁽⁷⁶⁾. A imunidade celular desempenha, portanto, um papel fundamental na defesa contra a infecção pelo HPV^(38, 43). O estágio de contenção, que envolve a regressão da infecção por este vírus, não é observado em indivíduos com déficit de função dos linfócitos T⁽⁷⁵⁾.

5. HPV E A IMUNODEFICIÊNCIA

Indivíduos que são imunocomprometidos desenvolvem lesões com aparência clínica não-usual. Estas lesões incluem tipos HPV não comumente vistos em lesões orais. O fato de que a imunossupressão é um fator predisponente para lesões associadas ao HPV, sugere que a regulação da imunidade tem um papel na patogênese destas lesões⁽⁴⁶⁾. Pacientes que recebem terapia imunossupressora

após transplantes de órgãos têm risco aumentado para o desenvolvimento de tumores malignos. A incidência de neoplasia nestes pacientes é 100 vezes maior que os controlados por idade⁽³⁴⁾. A causa para este aumento na incidência não é clara, mas pode ser devida à combinação de diminuição da detecção de células cancerígenas pelo sistema imune, estimulação antigênica crônica pelo órgão transplantado, efeitos carcinogênicos diretos de drogas imunossupressoras ou proliferação de vírus oncogênicos^(34, 35).

Zhang e colaboradores⁽³⁵⁾, ao comparar a presença de carcinoma de células escamosas oral em pacientes transplantados e não-transplantados, observa que prevalece a tendência desta lesão no sexo masculino porém, a manifestação ocorre em indivíduos mais jovem. O uso de tabaco e consumo de álcool são fatores menos freqüentes, o que sugere o envolvimento de outros fatores de risco neste câncer. Considera que a atipia celular deve ser cuidadosamente avaliada nos pacientes com doença do hospedeiro versus enxerto, onde a presença e grau de displasia é um sinal indicativo de possível desenvolvimento de lesão oral maligna⁽³⁵⁾.

Em transplantados renais, muitas das lesões, pré-malignas e malignas, em mucosa e tecido cutâneo têm sido associadas com a detecção de HPV de alto risco⁽⁷⁷⁾. Porém, neste estudo⁽⁷⁷⁾, onde pacientes portadores de HIV e transplantados renais foram pesquisados para a presença de HPV, os que se mostraram positivos continham HPV de baixo risco. Para Zhang e colaboradores⁽³⁵⁾, a maior diferença entre o perfil molecular do carcinoma de células escamosas oral em transplantados e não-transplantados foi o achado de infecção por HPV nas células cancerígenas.

O rápido aparecimento de verrugas em pacientes transplantados renais, não afetados previamente, é demonstrado durante tratamento imunossupressivo. Também é observado um aumento da incidência de infecção por HPV durante a

gravidez, e aumento da freqüência, da gravidade, e de recidivas em indivíduos positivos ao HIV^(75, 76).

Em estudo realizado por Campisi e colaboradores⁽⁷⁷⁾ através da PCR, pesquisou-se a presença de HPV em mucosa normal de pacientes HIV positivos que consistiu de um grupo de 57 indivíduos, grupo de transplantados renais de 40 indivíduos e o grupo controle de 30 voluntários saudáveis. HPV-DNA foi detectado em 8 dos indivíduos transplantados renais, 4 dos pacientes HIV+ e um dos indivíduos saudáveis. Todas as amostras continham HPV de baixo risco. HPV genoma foi detectado em mucosa oral clinicamente normal de pacientes HIV positivos e transplantados renais, com maior, mas não significativa diferença do grupo controle.

6. HPV E LESÕES ORAIS

A possibilidade da infecção por HPV ser a etiologia do carcinoma oral foi primeiramente sugerido por Syrjänen e colaboradores⁽⁷⁸⁾ em 1983, em estudo que procurou verificar evidências morfológicas e imuno-histoquímicas típicas do papilomavírus humano na carcinogênese de células escamosas orais. Neste estudo, 40% (16/40) dos espécimes de carcinoma oral analisados mostravam lesões sugestivas de HPV. Destas, 8 mostraram-se positivas para HPV por imunohistoquímica. A mesma série de biópsias foi analisada posteriormente por Chang e colaboradores⁽³⁾ por “hibridização in situ” e PCR revelando 12 (30%) amostras contendo HPV-DNA tipos 11, 16 ou 18. Em outro estudo⁽⁴⁸⁾, os autores encontraram HPV 6, 11, 16 e 18 em 6 de 51 carcinomas orais e em 6 de 21 lesões displásicas. O HPV 16 tem sido o tipo mais freqüente associado ao carcinoma oral^(7, 48). Um estudo⁽⁷⁾ observou o DNA do HPV 16 em 76,4% de 17 carcinomas de células

escamosas oral estudados. Outro estudo⁽⁷⁶⁾, em 1985, levantava a possibilidade do papilomavírus estar implicado em algumas lesões orais pré-malignas e malignas. Assim, protocolos para a investigação da infecção do HPV na orofaringe com diversas técnicas diagnósticas, incluindo pacientes portadores e não-portadores do HPV genital são sugeridos por alguns autores para uma análise comparativa mais fiel do perfil epidemiológico desta infecção.

A mucosa oral de 51 mulheres com diagnóstico clínico e histológico de HPV genital foi avaliada⁽⁷⁹⁾ através da coleta de material para esfregaço citológico. Neste estudo⁽⁷⁹⁾, a presença de colicitose foi considerada evidência da presença de HPV e, a discariose, a binucleação e a paraceratose como suspeita da presença de HPV na mucosa oral destas mulheres. Além disso, pacientes com lesão clínica de HPV genital apresentaram evidência ou suspeita de HPV oral mais freqüentemente que aquelas que tinham lesão subclínica de HPV. O estudo mostrou que o HPV pode estar presente na mucosa oral de mulheres portadoras de HPV genital, mesmo não havendo lesões clinicamente detectáveis na mucosa oral. No entanto, outro estudo⁽⁷⁴⁾ não observou o mesmo achado, concluindo ser infreqüente a presença de alterações de mucosa oral sugestivas de infecção por HPV em mulheres portadoras de infecção genital por este vírus.

Um estudo conduzido por Badaracco e colaboradores⁽⁸⁰⁾, avaliou 29 mulheres com idade entre 21 e 48 anos, sendo que a infecção por HPV foi demonstrada em 16 delas (55.2%). A taxa de detecção de HPV oral nestas mulheres foi 37.9% e no trato genital, 34.5%. Neste estudo⁽⁸⁰⁾, o HPV 16 foi o mais freqüentemente observado, seguido pelo HPV 6. Em 5 mulheres positivas para a infecção por HPV em cavidade oral e trato genital, 3 possuíam o mesmo tipo em ambos os sítios. No entanto, múltiplos tipos de HPV foram encontrados em 9 de 26 amostras, sendo que o HPV 6 esteve freqüentemente associado a outros tipos de

HPV neste estudo⁽⁸⁰⁾. Estes dados indicam a ocorrência de infecções múltiplas e a difusão de diferentes tipos de HPV na mucosa genital e cavidade oral.

Um risco aumentado para o câncer da cavidade oral, da faringe e da laringe, subsequente à ocorrência de câncer de colo de útero, tem sido observado e, sugere a possibilidade de um fator etiológico comum, ao lado do fumo⁽⁸¹⁾. O HPV tem sido encontrado em elevadas proporções em lesões do trato aerodigestivo superior, principalmente papilomas laringeais e lesões papilares orais⁽⁸¹⁾.

Entre os HPV conhecidos, os tipos 1, 2, 4, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 32, 57 têm sido encontrados em diferentes lesões da cavidade bucal. Destes, o tipo 13 e 32 são exclusivos de lesões da cavidade bucal, sendo comumente vistos na hiperplasia epitelial focal^(7, 46, 49, 74).

Os casos descritos de condiloma acuminado e de papiloma de células escamosas que contém HPV 13 ou 32 demonstram características histomorfológicas semelhantes à hiperplasia epitelial focal. No entanto, na maioria das vezes, não há associação preferencial demonstrada entre HPV tipo específico e uma lesão oral em particular⁽⁴⁶⁾.

Em estudo realizado por Sand e colaboradores⁽¹¹⁾ foram examinadas as biópsias de mucosa oral de 53 pacientes com diferentes lesões orais e de 12 pacientes controle saudáveis. Neste estudo⁽¹¹⁾, o material de biópsia foi examinado através da técnica PCR, utilizando-se “primers consensus” da região L1 e “primers” específicos para tipos HPV6/11, 16 e 18. Todos os pacientes controle foram negativos para a presença de HPV. As lesões observadas incluíam: 24 carcinomas, sendo 3 positivos para HPV (tipos 16, 6/11, 18 e um não específico); 22 lesões de líquen plano, sendo 6 positivas para HPV (tipos 5, 18 e um não específico), e 7 leucoplasias, com 2 HPV positivo (tipos 16 e 6/11). A associação com o HPV observada foi independente do uso de fumo e álcool.

Em outro estudo⁽⁸²⁾, onde foram avaliados 20 casos de leucoplasia pilosa oral de pacientes masculinos homossexuais, para verificar a presença de HPV e do vírus Epstein Barr (EBV) utilizando as técnicas de imunoperoxidase e de hibridização “in situ”, o HPV foi observado em apenas 1 caso, enquanto todos os demais eram positivos para EBV. Os autores deste estudo concluíram que o EBV é o mais prevalente agente viral na leucoplasia pilosa oral. A mesma prevalência ocorreu em estudo semelhante⁽⁸³⁾.

A hiperplasia epitelial focal (FEH) da mucosa oral é uma doença observada em elevada frequência entre esquimós da Groenlândia e Canadá ártico e, além destes, entre índios das Américas do Norte, Central e do Sul. A prevalência deste tipo de achado é consideravelmente menor no resto da população mundial. A distribuição geográfica e racial não usual, sugere que a susceptibilidade para a doença pode depender de fatores genéticos. No entanto, a observação de partículas de HPV e a detecção de grupo antígeno específico ou de HPV-13 em uma certa proporção destas lesões sugere que a FEH é uma doença associada a pelo menos um tipo específico de HPV⁽⁸⁴⁾. Em lesões de 10 pacientes com FEH de mucosa oral, sendo 4 deles esquimós da Groenlândia, foi investigada a presença de DNA para o HPV⁽⁸⁴⁾. O HPV 13, já associado à FEH, foi encontrado nos esquimós e, o HPV 32 foi encontrado nos outros 6 pacientes. O investigadores sugeriram então que provavelmente a FEH da mucosa oral é uma doença associada a 2 tipos específicos de HPV, o 13 e o 32.

Ward e colaboradores⁽⁵¹⁾, examinaram os papilomas orais de 19 pacientes que tinham diagnóstico clínico e confirmação histológica, através da técnica PCR e após, os produtos da PCR foram submetidos a técnica de hibridização por “dot blot” para o DNA do HPV tipos 6, 11, 16 e 18. Os HPV tipos 6 e 11 ou ambos foram

identificados em 68% destas lesões sugerindo a possibilidade de um papel etiológico do HPV na patogênese dos papilomas de células escamosas orais.

Em um estudo realizado por Martínez e colaboradores⁽⁸⁵⁾ entre os anos de 1963 e 1982, em pacientes que procuraram um serviço público de saúde no México, 67 lesões de papiloma bucal (3,1% das biópsias) são investigadas. Neste local o atendimento era dispensado a indivíduos com idade superior a 16 anos. A média de idade dos pacientes avaliados era $39,5 \pm 16$ e variava entre 16 a 70 anos, sendo que as lesões foram mais freqüentes na 3ª década de vida, em mulheres (1,4:1) e com localização preferencial na língua. O tratamento utilizado foi o de extirpação total com margens de segurança havendo apenas um caso de recorrência e nenhuma evolução para a malignidade. Um índice de 9% de confusão no diagnóstico clínico entre papiloma e fibroma ainda é descrito porém ressalta-se que é menor que em outros estudos.

A prevalência de HPV observada em pacientes com câncer oral é bastante variada (0 a 100%)^(7, 45, 49). Esta variabilidade pode estar relacionada ao tamanho da amostra estudada ou mesmo à sensibilidade da técnica diagnóstica empregada. Algumas das pesquisas^(49, 50, 86) não incluíam amostras controle ou tinham um pequeno número de amostras controle comparados com o número de casos. Outra dificuldade relatada em estudos da carcinogênese oral inclui a obtenção de espécimes de biópsia oral normal de indivíduos saudáveis e até mesmo a obtenção de múltiplas biópsias de um mesmo indivíduo. Além disso, informações adicionais e relevantes em relação ao grupo controle, com freqüência não são completados, em especial sobre co-fatores conhecidos na carcinogênese oral como o uso de tabaco e consumo de álcool⁽⁴⁹⁾.

O desenvolvimento do câncer oral prossegue através de mudanças genéticas moleculares sucessivas que são adquiridas de uma integridade genômica

perdida após continuada exposição a fatores de risco ambiental. De particular importância temos os carcinógenos químicos relacionados ao tabaco e a infecção por HPV. O genoma HPV sozinho fracassou em dar um aumento na população de células tumorigênicas, as quais requerem também exposição a carcinógenos químicos. Quando expostos a agentes danosos, os HPV exibem um prejudicado controle do ciclo celular e da atividade de reparo do DNA, além de uma acumulada frequência de mutações induzidas por mutagênicos ou mesmo espontâneas. Além disso, a expressão de oncoproteínas E6 e E7 de HPV de alto risco foram suficientes para aumentar a frequência de mutação em ceratinócitos normais. Estes achados sugerem que a infecção viral em combinação com a existência de carcinógenos químicos podem ser a causa mais importante de indução de instabilidade genética e desenvolvimento de câncer oral⁽¹⁸⁾.

O HPV 16 está mais relacionado a lesões pré-cancerosas e ao câncer, conforme descrito por alguns investigadores^(3, 4, 7, 63), os quais observaram que em mais de 80% das leucoplasias orais e de 46% dos carcinomas de língua e assoalho de boca este tipo viral estava presente. Este tipo viral também tem sido observado em tecidos histologicamente normais⁽⁴⁹⁾. Maitland e colaboradores⁽⁴⁾ identificaram o HPV 16 em 41% de espécimes de biópsia oral normal. Células esfoliativas orais de adultos saudáveis e de pré-escolares foram examinadas com a técnica PCR⁽⁴⁹⁾. Em adultos, HPV 6b e HPV 16 estavam presentes em 17% e 23% das amostras, respectivamente e, em pré-escolares estes tipos foram observados em 24% e 19%, respectivamente. Em outro estudo similar⁽⁸⁷⁾, o HPV 16 foi identificado em 6 de 10 amostras de mucosa bucal histologicamente normal. Estes achados sugerem que o HPV, particularmente o tipo 16, pode estar presente na mucosa oral normal de forma assintomática ou latente⁽⁴⁹⁾.

Um estudo realizado por Mao e colaboradores⁽⁴⁹⁾ observou a presença de HPV 16 em 30,8% dos pacientes com carcinoma oral. Em contraste, 26,9% dos sítios não afetados do mesmo grupo de pacientes também testaram positivos ao HPV. Assim, enquanto alguns estudos sugerem uma associação mais forte entre o HPV 16 e o carcinoma oral, outros sugerem que não há uma evidência suficientemente clara dessa associação. Esta observação está de acordo com publicação cujo estudo identificou a presença HPV 16 em um elevado percentual de tecido epitelial normal⁽⁴⁾. Estes achados reforçam a hipótese de que o DNA do HPV 16 possa estar envolvido na carcinogênese oral, no entanto que a sua ação isolada não tem um papel significativo na causa do câncer oral^(49, 88).

Foram estudadas, por Bustos e colaboradores⁽¹⁰⁾, 33 amostras de biópsias de carcinoma oral e, 33 amostras controle de pacientes com mucosa oral normal. A prevalência de HPV entre as 33 amostras de casos estudada foi de 27,27%. Nas amostras controle não houve detecção de HPV. Entre os HPV positivo, 3/9 (33,33%) eram em carcinomas espinocelulares e 5/9 (55,56%) em carcinomas verrucosos e, o vírus foi o fator de risco mais importante; somente 1 era fumante e nenhum ingeria mais de 60g de álcool por dia. O carcinoma verrucoso foi a neoplasia associada com mais frequência à infecção por HPV o que poderia sugerir um maior papel do HPV na patogênese deste carcinoma. A presença viral encontrada em lesões cancerosas reforça a natureza multicausal do câncer oral.

O significado biológico da associação HPV e câncer oral se encontra na alteração de pontos críticos do controle do ciclo celular, através de oncoproteínas virais (E6 e E7), que formam um complexo com proteínas celulares que regulam negativamente a proliferação celular (p53 e p105 RB) e neutralizam sua função⁽¹⁰⁾.

Alguns investigadores⁽⁸⁹⁾, examinaram 40 pacientes com carcinoma oral de células escamosas e 20 indivíduos com mucosa oral normal para determinar uma

possível relação entre as infecções por HPV 16 e 18 e a alteração da proteína p53 nesta doença. A infecção por HPV 16/18 foi observada em 29 dos espécimes tumorais sendo que destes, 11 também apresentavam alteração de p53. A proteína p53 encontrava-se alterada em um total de 18 espécimes tumorais. Os autores concluíram que ambos, a infecção por HPV 16/18 e a alteração de p53, juntos ou separados, estão associados ao carcinoma oral de células escamosas, porém não foi observada uma relação entre eles⁽⁸⁹⁾. No entanto, outro estudo⁽⁹⁰⁾ aponta que esta relação existe, sugerindo um efeito mutagênico no carcinoma oral de células escamosas pelo HPV 16. Este estudo observou, porém, que nem a infecção por HPV ou a mutação p53 influenciaram a sobrevida dos pacientes.

O HPV isolado MM4 (W13B) foi identificado por Manos e colaboradores⁽⁹¹⁾ em uma co-infecção com HPV 53 em uma paciente com citologia normal e, em 3 de 30 tumores cervicais HPV positivo de pacientes das Philipinas sugerindo um cluster geográfico. Porém, a identificação do MM4 mas não de outro tipo HPV em biópsias de 2 pacientes mexicanas com câncer cervical mostra o alto potencial oncogênico deste HPV e indica que ele não se encontra restrito às Philipinas ou oriente asiático⁽⁹²⁾.

O HPV 73, outro raro tipo HPV (anteriormente designado MM9 ou PAP238A), foi detectado e seqüenciado de uma verruga oral com atipia de um paciente com HIV positivo⁽⁴⁵⁾. A constante detecção de HPV 73 em swabs cervicais de uma paciente que progrediu de baixa a severa displasia após 1,5 anos indica a persistência da infecção por HPV 73 e mostra sua associação com a progressão maligna⁽⁹²⁾, estando de acordo com estudos prévios onde a aparente infecção única por PAP238A e W13B em vários espécimes de câncer cervical invasivo, sugere associação com câncer⁽⁹¹⁾.

7. DIAGNÓSTICO DE HPV

O diagnóstico do HPV pode ser clínico, citológico, histopatológico, imuno-histoquímico, por microscopia eletrônica e molecular^(75, 76). Assim, o diagnóstico deste vírus é obtido pela detecção dos seus efeitos morfológicos sobre a citologia, ou do seu DNA ou RNA^(38, 76, 93), salientando que, em decorrência da falta de um sistema celular susceptível para o isolamento e identificação do vírus, e, pela ausência de provas sorológicas adequadas, o diagnóstico da infecção pelo HPV com a identificação da presença viral está baseado, fundamentalmente, na detecção do ácido nucléico viral⁽⁹⁴⁾.

Diagnóstico clínico

A infecção pelo HPV pode ser clínica, subclínica e/ou latente. A infecção clínica é aquela em que o diagnóstico pode ser feito através de lesões visíveis ou através de um microscópio, sendo que os sintomas clínicos podem estar presentes ou não. Já na infecção subclínica, as lesões são microscópicas e o diagnóstico costuma ser através de exame citopatológico, ou de exame colposcópico (quando HPV genital) e/ou por exame molecular. Na infecção latente, o diagnóstico só é possível através da detecção do DNA do vírus, já que não existem lesões ou alterações microscópicas passíveis de identificação da infecção viral⁽⁴⁴⁾.

O exame clínico é o primeiro e, um passo essencial, para diagnosticar lesões associadas ao HPV. Com o auxílio de um instrumento de amplificação, a maioria das lesões pode ser identificada em diferentes sítios humanos e diferenciada de condições fisiológicas ou patológicas que assemelham-se a lesões virais. O colposcópico, um instrumento de amplificação, é freqüentemente utilizado para

examinar a cérvix uterina, a vagina, a genitália externa, a uretra e o ânus. Estudos recentes têm mostrado o seu uso também na tentativa de identificação de lesões na cavidade oral^(8, 93).

Diagnóstico citopatológico e histopatológico

O diagnóstico da infecção pelo papilomavírus humano pode ser feito tanto citológica como histologicamente, baseado nas alterações de efeitos citopáticos induzidos pelo vírus. Morfologicamente, a infecção pelo HPV na pele ou mucosa pode produzir hiperplasia epitelial e efeitos citopáticos nas camadas superficiais do epitélio, chamados de atipias coilocíticas. A atipia coilocítica, patognomônica da infecção produzida pelo HPV, é caracterizada por núcleo pequeno, irregular e hiper cromático associado a uma cavidade perinuclear de limites nítidos e periferia citoplasmática adensada^(20, 74, 76, 86, 95). Outro critério considerado diagnóstico é a disceratose (ceratinização anômala intra-epitelial). A paraceratose (células escamosas nucleadas em miniatura) é geralmente vista na superfície do epitélio⁽⁷⁴⁾. As camadas do epitélio também podem apresentar projeções espessadas (papilomatose), especialmente nas lesões exofíticas produzidas pelos tipos de HPV não oncogênicos 6 e 11^(43, 76).

Apesar das alterações citológicas características do HPV, cerca de 1/3 das infecções por HPV podem passar despercebidas citologicamente se o diagnóstico for baseado apenas no encontro de alterações coilocíticas. Critérios citológicos menores, como a disceratose, caracterizada por alterações citoplasmáticas induzidas pelo HPV, aumentam a sensibilidade do exame citológico de rotina⁽⁷⁵⁾ às custas de uma significativa diminuição da especificidade.

Já o exame histológico permite a identificação de lesões associadas ao HPV na maioria dos casos. No entanto, apesar de identificação clara de lesões tipo as neoplasias intra-epiteliais cervicais que têm um risco elevado de progredir para câncer, este exame não permite, a identificação do tipo de HPV associado ao efeito citopático ou, a identificação de infecção latente⁽⁷⁵⁾.

Diagnóstico molecular

Embora o exame clínico possa ser útil para a identificação de uma infecção pelo HPV, e o exame citológico e histológico possa corroborar este achado, somente testes específicos de biologia molecular permitirão a identificação do DNA do HPV, informando a existência da infecção, mesmo na ausência de alterações morfológicas. A identificação direta do DNA ou do RNA do HPV é, assim, o método de escolha para a detecção de HPV em esfregaços ou amostras de tecidos⁽⁹³⁾.

Existem duas categorias de detecção do DNA viral: aquelas que identificam ácidos nucleicos diretamente (southern blot, hibridização in situ com filtro, hibridização in situ, dot blot-virapap/viratype e captura híbrida) e uma segunda categoria onde primeiro são amplificados os ácidos nucleicos e posteriormente são identificados os produtos amplificados⁽⁴¹⁾; o único método de amplificação corretamente utilizado é a reação em cadeia da polimerase (PCR).

Hibridização⁽⁹³⁾ - As moléculas de DNA ou de RNA podem existir em estado de fita simples ou dupla. Sob condições apropriadas, as fitas simples complementares de DNA ou de RNA parearão para formar uma dupla por um processo chamado de pareamento de bases, reanelamento, hibridização ou formação dúplex. Uma vez que o DNA viral é de fita dupla, as fitas de DNA devem ser separadas e desnaturadas para produzir alvos acessíveis, os quais podem ser

detectados por sondas específicas DNA ou RNA. Este processo reverso, que converte as fitas duplas dos ácidos nucleicos no formato de fitas simples é chamado de desnaturação ou fusão e é geralmente executado em pH altamente alcalino ou elevada temperatura ou em concentrações extremamente altas de sal de íon não-fisiológicas. A estabilidade do dúplice se deve às pontes de hidrogênio entre os pares de base complementares. Ambas as fitas se separam em uma temperatura de fusão específica quando a força de ligação das pontes de hidrogênio é superada. Fatores como a concentração de formamida e íons de sais, comprimento das fitas de ácido nucleico e conteúdo de guanosina-citosina influenciam a estabilidade da molécula de fita dupla. Ou seja, a estabilidade do complexo resulta de um alto grau de pareamento do nucleotídeos.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) - A utilização desta técnica em estudos epidemiológicos investigando a relação entre HPV e câncer cervical promoveu uma verdadeira reviravolta nesta linha de pesquisa onde comprovou-se ser o HPV o fator de risco principal para a neoplasia cervical e, os resultados negativos anteriores foram atribuídos às técnicas diagnósticas de baixa sensibilidade e especificidade empregadas⁽⁷⁵⁾.

É um método utilizado para amplificação de pequenas quantidades de seqüências específicas de DNA, sendo este o motivo de sua grande sensibilidade. Após a extração do DNA procede-se à amplificação, com uma mistura composta de: amostra do DNA-alvo, iniciadores (primers) específicos da reação, DNA-polimerase termoestável, os quatro desoxirribonucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) e solução tampão.^(96, 97)

PCR é iniciada pela separação de uma dupla fita de DNA em 2 fitas simples por aquecimento a 90-100°C. A amplificação do DNA através da PCR é obtida utilizando-se iniciadores oligonucleotídeos (“primers”). Os “primers” são moléculas

de DNA curtas, de hélice simples, complementares às partes terminais de uma seqüência definida do DNA. Segue-se o anelamento do “primer” de oligonucleotídeos sintetizados orientados para a região de interesse a uma baixa temperatura, baseado no ponto de fusão ou temperatura de dissociação dos “primers”. Bases nucleotídicas são adicionadas a estes “primers” em uma direção 5’ a 3’ por uma polimerase DNA termoestável para completar 2 idênticas cópias do DNA original (alvo). Este processo é repetido por 30 a 35 ciclos, com produtos de extensão sintetizados novamente servindo como modelo para subsequente desnaturação, resultando em uma amplificação exponencial de uma região específica, definida da região original do DNA modelo.⁽⁹⁸⁾

Os produtos do PCR são rotineiramente visualizados, após eletroforese, em gel de agarose corados com brometo de etídio os quais fazem com que o processo seja facilmente adaptável a uma variedade de laboratórios.

As reações de PCR mais utilizadas na literatura empregam “primers” amplificando a parte do gene L1. Tal estratégia se justifica por ser esta a região mais conservada na seqüência de DNA entre os diferentes tipos de HPV, permitindo a detecção da sua grande maioria. Destacam-se os “primers” MY09/MY11, descritos por Manos e colaboradores^(75, 99, 100) e os “primers” GP5+ / GP6+, utilizados por J. Walboomers e colaboradores^(75, 93). O par de iniciador genérico mais utilizado para amostras orais tem sido o MY09/MY11⁽⁹⁸⁾.

A PCR é, portanto, um processo térmico, cíclico, automatizado onde, em uma reação bem sucedida, após 30 ciclos são produzidas mais de 10⁶ cópias de DNA^(93, 101).

A principal desvantagem da PCR deriva de sua alta sensibilidade que leva a um grande número de diagnósticos positivos sem correlação clínica, sendo, portanto, um teste de baixo valor preditivo positivo, mas de altíssimo valor preditivo

negativo⁽⁷⁵⁾. O diagnóstico molecular não deve ser usado como forma de rastreio populacional.

Devido à eficiente amplificação de traços de DNA, pequenos tecidos como um simples cabelo ou células coletadas da cavidade oral por um enxaguatório, os quais produzem de 2 a 5 µg de DNA, são suficientes para iniciar o modelo de PCR. Por ser uma técnica extremamente sensível, resultados falso-positivos podem, ocasionalmente, ocorrer⁽⁹⁸⁾.

8. GENOTIPAGEM DO HPV POR RESTRIÇÃO ENZIMÁTICA

Estudos prévios têm mostrado que a identificação de tipos de HPV através da digestão com enzimas específicas (Restriction Fragment Length Polymorphism – RFLP) é um método simples e acurado^(66, 67).

Quarenta e um dos tipos HPV mucosais podem ser identificados por este método. E, todos eles podem ser amplificados por PCR com “primers consensus” da região L1⁽⁶⁷⁾. Cada um dos tipos de HPV tem uma seqüência específica e, de acordo com a combinação dos resultados produzidos pela digestão com cada uma das enzimas, é possível identificá-los^(38, 67).

O painel de enzimas para a realização do RFLP é: *Bam H I*, *Dde I*, *Hae III*, *Hinf I*, *Pst I*, *Rsa I* e *Sal 3a I*.

O quadro 4 descreve uma comparação entre a sensibilidade e especificidade dos vários métodos diagnósticos.

Quadro 4. Comparação entre os Métodos de Diagnóstico Laboratorial⁽⁷⁵⁾

Exame	Grau de dificuldade	Sensibilidade	Especificidade	Discriminação tipos de HPV	Quantificação viral
citológico*	baixa	baixa	baixa	não	não
histológico	baixa	baixa	baixa	não	não
imuno-histo-químico**	moderada	moderada	alta	sim	não
captura híbrida	baixa	alta	alta	sim	sim
hibridização <i>in situ</i> **	moderada	alta	alta	sim	não
PCR extraído	alta	alta	alta	sim	não
PCR <i>in situ</i> **	muito alta	alta	alta	sim	não
hibridização <i>Southern blot</i>	muito alta	alta	alta	sim	não

* método de rastreio populacional e não de diagnóstico
 ** permitem correlação com o aspecto morfológico da lesão

9. LESÕES ORAIS MAIS COMUNS

1. Condiloma Acuminado

Também chamado de Verruga Venérea por ser freqüente na região anogenital. É uma proliferação, induzida por vírus, do epitélio escamoso estratificado da genitália, região perianal, boca e laringe. Parece estar associado ao HPV-6, HPV-11, HPV-16 e HPV-18, entre outros. É considerada uma doença sexualmente transmissível(DST), com lesões desenvolvendo-se no local de contato sexual ou trauma. São mais comuns na região anogenital que na boca e representam cerca de 20% de todas as DST diagnosticadas .

O período de incubação de um condiloma é de uma semana a três meses a partir do momento do contato sexual. Uma vez presente, a auto-inoculação para outros locais de trauma é possível.

Características Clínicas

São normalmente diagnosticados em adolescentes e jovens adultos, mas pessoas de todas as idades são suscetíveis. As lesões orais ocorrem, com mais freqüência, na mucosa labial, palato mole e freio da língua. O condiloma típico apresenta uma mucosa rosa, exofítica, firme e séssil, com projeções superficiais embotadas e curtas, semelhantes a uma couve-flor que proliferam e coalescem. Em geral, assintomáticos. Tendem a ser maiores que os papilomas, e são caracteristicamente múltiplos e aglutinados. O tamanho médio da lesão é de 1 a 1,5 cm, mas lesões orais de até 3 cm têm sido relatadas. O diagnóstico diferencial de papiloma de células escamosas e em alguns casos, de carcinoma verrucoso deve ser realizado.

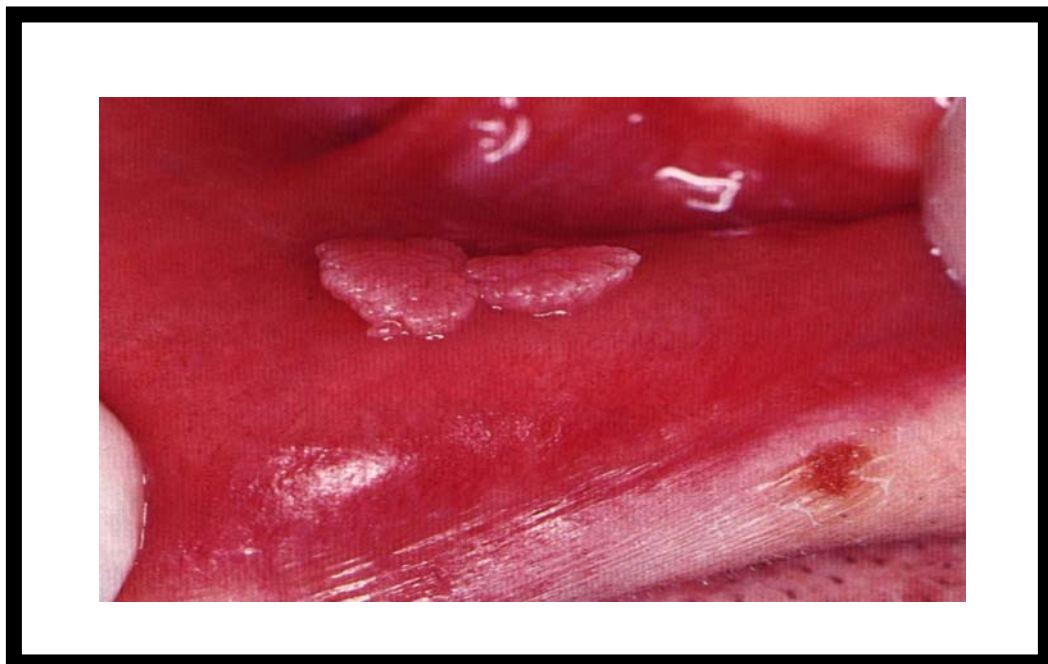


Fig. 3 – Condiloma Acuminado (Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento)¹⁰²

Características Histopatológicas

Aparece como uma proliferação benigna de epitélio escamoso estratificado acantótico, com projeções papilares superficiais levemente ceratóticas. Núcleos delgados de tecido conjuntivo apóiam as projeções epiteliais papilares dando-lhes uma aparência de criptas cheias de ceratina entre proeminências.

O epitélio de revestimento é maduro e diferenciado, mas as células espinhosas, às vezes mostram núcleos picnóticos cercados por zonas claras (coilócitos), um aspecto microscópico da infecção por HPV. O exame ultra-estrutural revela vírions dentro do citoplasma ou núcleos de coilócitos, e o vírus também pode ser mostrado por análise imunoistoquímica, hibridização “in situ” e técnicas de reação em cadeia da polimerase.

Tratamento e Prognóstico

São normalmente tratados por excisão cirúrgica conservadora. Pode ser tentada a aplicação tópica de Podofilina. A ablação a laser tem sido usada, mas

este tratamento tem levantado questões como o transporte pelo ar de HPV pelas microgotas aerossolizadas, criadas pela vaporização do tecido lesional. Independente do método utilizado, os condilomas devem ser removidos, porque são contagiosos e podem-se espalhar para outras superfícies orais e para outras pessoas, através do contato sexual, normalmente direto. Na área anogenital, esta lesão pode demonstrar um caráter pré-maligno, especialmente quando infectada com o HPV-16 ou HPV-18, que no entanto, não têm sido demonstrados em lesões orais.

2.Verruga Vulgar

Também chamada Verruga Comum, é uma hiperplasia do epitélio escamoso estratificado benigna, induzida por vírus e focal. Os vírus associadas são HPV-2, HPV-4 e HPV-40. Outros trabalhos mostraram a presença de HPV 6, 11 e 57. A verruga vulgar é contagiosa e pode se espalhar para outras partes da pele ou das membranas mucosas de uma pessoa, por auto-inoculação. Não é comum na mucosa oral, mas extremamente comum na pele.

Características Clínicas

É freqüentemente descoberta em crianças, mas lesões ocasionais podem surgir até mesmo em pessoas de meia-idade. A pele das mãos é o local de infecção. Quando a mucosa oral está envolvida, as lesões são normalmente encontradas na zona do vermelhão do lábio, mucosa labial ou parte anterior da língua. Possui aspectos clínicos semelhantes ao papiloma (lesão exofítica, digitiforme, circunscrita, sésil, esbranquiçada e firme). Pode ser pedunculada e, as lesões cutâneas de coloração rosa, amarela ou branca. A verruga vulgar cresce rapidamente para o seu tamanho máximo, normalmente menos que 5 mm, e o

tamanho permanece constante por meses ou anos, a menos que a lesão esteja irritada. As lesões múltiplas ou aglomeradas são comuns.



Fig. 4 – Verruga Vulgar (Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento)¹⁰²

Características Histopatológicas

É caracterizada por uma proliferação de epitélio escamoso estratificado hiperqueratótico, arrumado em projeções pontudas ou em forma de dedo, com núcleos de tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo de apoio é frequentemente infiltrado por células inflamatórias crônicas. As cristas interpapilares alongadas tendem a convergir para o centro da lesão, produzindo um efeito de “evacuação”. Uma camada de células granulares proeminentes (hipergranulose) exhibe grânulos cerato-hialinos ásperos e agregados. Uma abundância de coilócitos é frequentemente vista na camada espinhosa superficial. Coilócitos são células epiteliais de HPV alterado, com espaços perinucleares claros e picnose. Inclusões

virais intranucleares eosinofílicas são, algumas vezes, percebidas dentro das células da camada granular.

Tratamento e Prognóstico

As verrugas da pele são eficientemente tratadas por excisão cirúrgica conservadora ou curetagem, crioterapia com nitrogênio líquido, ou aplicação tópica de agentes ceratinolíticos (normalmente contendo ácido salicílico ou ácido láctico). As lesões orais são normalmente ressecadas cirurgicamente, ou podem ser destruídas por crioterapia ou eletrocirurgia. A recorrência é verificada em proporções pequenas, nos casos tratados. As verrugas não se transformam em lesões malignas, e dois terços desaparecem espontaneamente dentro de dois anos, especialmente em crianças.

3.Papiloma de Células Escamosas

É uma proliferação benigna do epitélio escamoso estratificado, presumivelmente induzida pelo papilomavírus humano(HPV). Os tipos virais HPV-6 e HPV-11 têm sido identificados em até 50% dos papilomas orais. O modo exato de transmissão é desconhecido. Contrariamente a outras lesões induzidas por HPV, os vírus, nesta lesão, parecem ter uma virulência e uma taxa de infectuosidade extremamente baixas. Tem sido sugerido um período de latência ou incubação de 3 a 12 meses. Os papilomas contribuem com aproximadamente 3% das lesões submetidas à biópsia e são encontrados em quatro para cada 1.000 adultos. Embora alguns autores tenham especulado que os papilomas se desenvolvem predominantemente em crianças, os estudos epidemiológicos parecem confirmar o seu aparecimento em qualquer idade.

Características Clínicas

É a lesão mais comum das massas de tecido mole e considerada um tumor benigno. Ocorre em qualquer idade principalmente da 3ª à 5ª década, com a mesma freqüência em homens e mulheres, e em qualquer sítio da cavidade oral. É mais freqüente no palato mole, dorso e bordos da língua e lábio inferior. É uma lesão mole, indolor, pequena, normalmente exofítica, pedunculada, com numerosas projeções semelhantes a dedos na superfície, que lhe dão uma aparência de couve-flor ou verruga. As lesões podem ser brancas, vermelho-claras, ou de cor normal, dependendo da quantidade de ceratinização da superfície. Os papilomas são normalmente solitários e caracteristicamente aumentam de modo rápido para o tamanho máximo de 0,5 cm, com pequena ou nenhuma mudança após isso. Entretanto, têm sido relatadas lesões que chegam a 3 cm de diâmetro. A similaridade entre condiloma acuminado ou verruga vulgar e papiloma pode ser responsável por erros na freqüência ou prevalência destas lesões.



Fig. 5 – Papiloma Oral (acervo próprio)

Características Histopatológicas

É caracterizado por uma proliferação do epitélio estratificado escamoso ceratinizado, ordenado em projeções semelhantes a dedos, com núcleos de tecido conjuntivo fibrovascular. Os núcleos de tecido conjuntivo podem apresentar mudanças inflamatórias crônicas, dependendo da quantidade de trauma sustentado pela lesão. A camada de ceratina pode ser espessa em lesões com uma aparência clínica mais branca, e o epitélio tipicamente mostra um padrão de maturação normal. Papilomas ocasionais mostram hiperplasia basilar e atividade mitótica, que podem ser confundidas com displasia epitelial branda.

Tratamento e Prognóstico

A excisão cirúrgica conservadora, incluindo a base da lesão, é um tratamento adequado para um paciente com papiloma escamoso, sendo a recorrência improvável. Frequentemente, lesões têm sido deixadas sem tratamento por anos, sem que ocorra transformação maligna, aumento de tamanho contínuo ou disseminação para outras partes da cavidade oral. Os papilomas escamosos da laringe possuem um comportamento diferente dos orais. As lesões laríngeas tendem a recorrer com mais frequência, após a terapia, e possuem maior possibilidade de ser proliferantes múltipla e continuamente.

4. Hiperplasia Epitelial Focal – Doença de Heck

É uma proliferação localizada e induzida por vírus do epitélio escamoso oral, primeiramente descrita em americanos nativos (norte e sul-americanos) e esquimós. Hoje, sabe-se que existe em muitas populações e grupos étnicos, sendo produzida por um dos tipos de HPV, o HPV-13 e o HPV-32. Em populações isoladas, até 39% das crianças podem ser infectadas. Descrita em 1965 por Archard, Heck e Stanley.

Características Clínicas

Normalmente uma condição infantil, ocasionalmente afetando adultos jovens e de meia-idade. Não há tendência de gênero. Os locais de maior envolvimento incluem as mucosas labial, jugal e lingual, mas lesões gengivais e tonsilares têm sido relatadas.

Apresenta pápulas e placas moles e chatas, normalmente da cor da mucosa normal, mas também podem ser pálidas ou, raramente, brancas. Ocasionalmente mostram uma leve mudança na superfície papilar. As lesões individuais são pequenas (0,3 a 1 cm), discretas e bem demarcadas, mas freqüentemente se encontram tão aglutinadas que toda a área fica com uma aparência pavimentada ou fissurada.

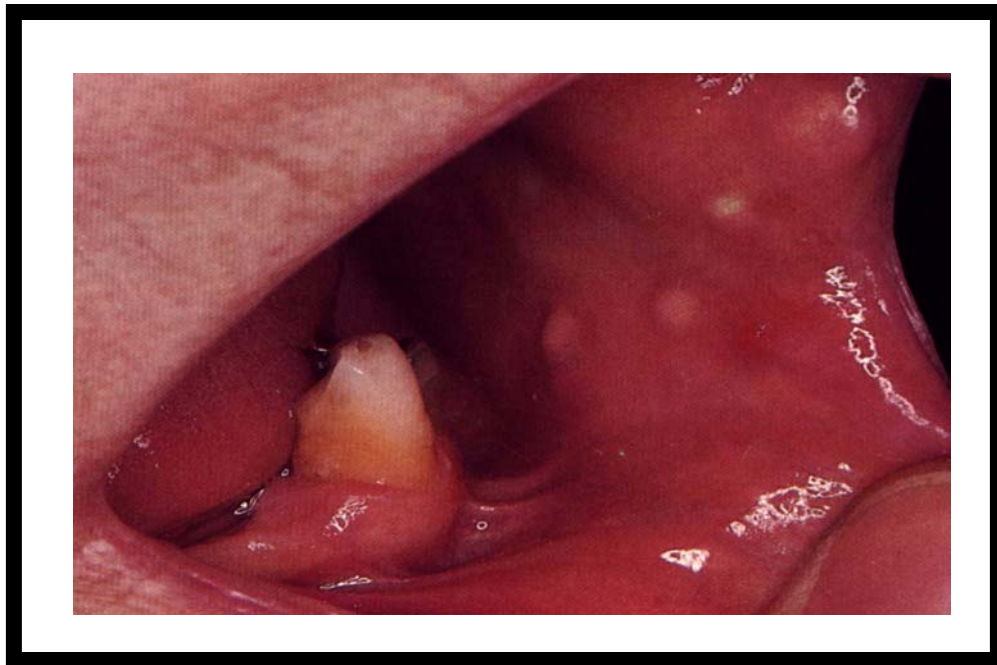


Fig. 6 – Hiperplasia Epitelial Focal(Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento)¹⁰²

Características Histopatológicas

É uma acantose abrupta e, muitas vezes, considerável do epitélio oral. Como a mucosa espessa cresce para cima, e não para dentro dos tecidos conjuntivos subjacentes, as cristas interpapilares lesionais atingem a mesma profundidade que as cristas interpapilares normais adjacentes. As próprias cristas são mais largas, freqüentemente confluentes e, algumas vezes, claviformes. Alguns ceratinócitos superficiais mostram uma mudança coilocítica semelhante à vista em outras infecções HPV. Outros ocasionalmente demonstram um núcleo alterado, que lembra uma figura mitótica. Isto presumivelmente resulta de alteração viral das células. Partículas semelhantes a vírus têm sido notadas ultra-estruturalmente dentro do citoplasma e dos núcleos das células da camada espinhosa, e a presença de HPV têm sido demonstrada por hibridização de DNA “in situ” e análise imunohistoquímica.

Tratamento e Prognóstico

A regressão espontânea tem sido verificada após meses ou anos, sendo confirmada pela raridade da doença em adultos. A excisão cirúrgica conservadora pode ser feita para diagnóstico ou por razões estéticas. O risco de recorrência após essa terapia é mínimo, e não há potencial de transformação maligna.

5. Líquen Plano

É uma doença dermatológica crônica relativamente comum, que freqüentemente afeta a mucosa oral. Apesar do termo sugerir uma condição chata e fúngica, evidência recente indica que se trata de um distúrbio mucocutâneo imunologicamente mediado. Uma variedade de medicamentos pode induzir a lesões que se parecem clinicamente com a forma idiopática da condição. A relação de

tensão ou ansiedade com o desenvolvimento do líquen plano é controversa, entretanto, uma explicação alternativa pode ser a de que pacientes com líquen plano simplesmente respondem dessa forma em níveis de tensão que não induzem a lesões em outras pessoas.

Características Clínicas

A maioria dos pacientes é constituída de adultos de meia-idade. É raro crianças serem afetadas. Predomina em mulheres, geralmente em uma razão de 3:2 em relação aos homens. Aproximadamente 1% da população pode ter líquen plano cutâneo. A prevalência do líquen plano oral é entre 0,1 e 2,2%.

Há essencialmente duas formas de líquen plano: reticular e erosiva.

Líquen Plano Reticular

É mais comum que a forma erosiva e, normalmente não causa sintomas e envolve a mucosa bucal posterior bilateralmente. Outras superfícies da mucosa oral podem estar envolvidas ao mesmo tempo, como o dorso e a parte lateral da língua, as gengivas e o palato.

É assim chamado por causa de seu padrão característico de linhas brancas entrelaçadas (também denominadas estrias de Wickham); entretanto, as lesões brancas podem se apresentar como pápulas em alguns casos. Estas lesões são tipicamente não-estáticas, aumentando ou diminuindo por semanas ou meses. O padrão reticular pode não ser evidente em alguns locais, como o dorso da língua, onde as lesões se apresentam mais como placas ceratóticas com a atrofia das papilas. O diagnóstico é feito freqüentemente com base nas descobertas clínicas.



Fig. 7 – Líquen Plano Reticular (Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento) ¹⁰²

Líquen Plano Erosivo

Ulceração rara ocorrendo habitualmente na bochecha, preferentemente em adulto. Mais significativo para o paciente porque as lesões são sintomáticas. Apresenta-se como uma ulceração superficial ao redor da qual se vê linhas esbranquiçadas do tipo usual de líquen plano. Não pode ser removida por raspagem simples. Clinicamente, existem áreas atróficas e eritematosas, com ulceração central em vários graus. A periferia das regiões atróficas é normalmente cercada por finas estrias radiantes. Algumas vezes, a atrofia e ulceração estão confinadas à mucosa gengival, produzindo um padrão de reação chamado Gengivite Descamativa. Em tais casos, amostras de biópsia devem ser obtidas para os exames de imunofluorescência e microscopia ótica do tecido perilesional, já que o

penfigóide cicatricial e o pênfigo vulgar podem se apresentar de uma forma semelhante. O exame histopatológico pode descartar outras doenças vesiculoerosivas como o lúpus eritematoso e, a estomatite ulcerativa crônica. As lesões liquenóides erosivas isoladas devem ser biopsiadas para descartar mudanças pré-malignas ou malignidade. Estas lesões podem ser confundidas com *reação liquenóide a amálgama dentário* que possui características clínicas e histopatológicas semelhantes.

Se o componente erosivo for grave, poderá ocorrer separação epitelial que resulta em uma apresentação relativamente rara do líquen plano bolhoso.

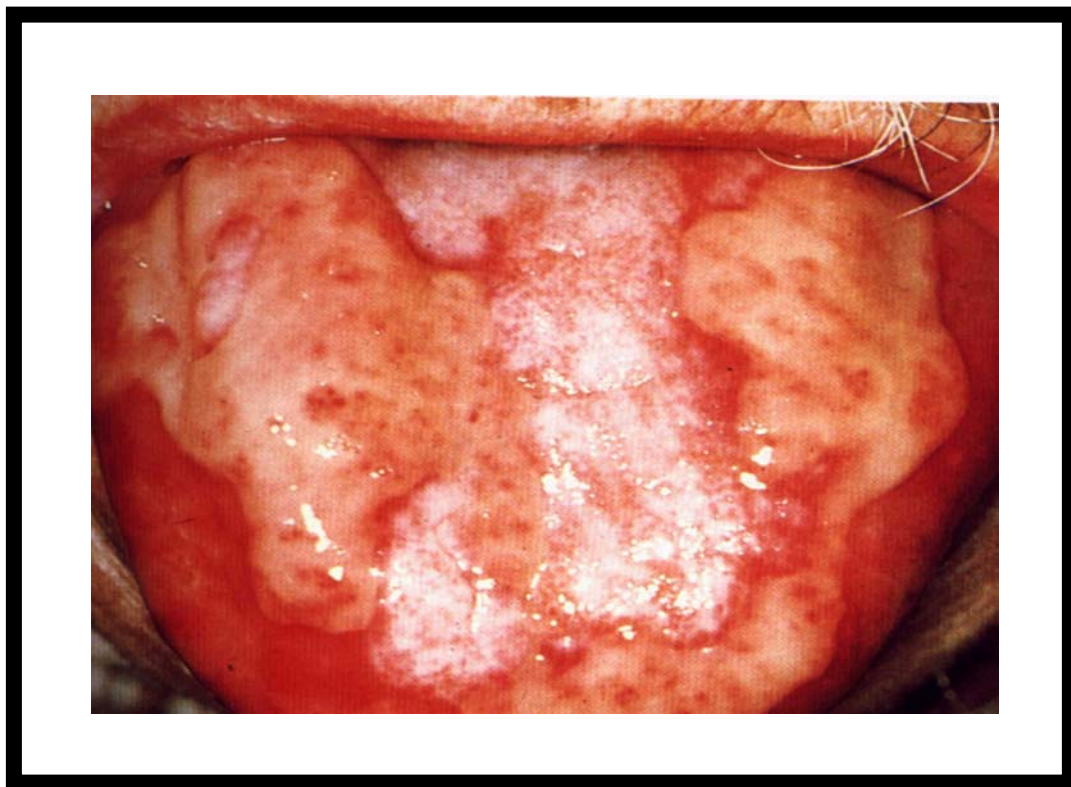


Fig. 8 – Líquen Plano Erosivo (Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento)¹⁰²

Características Histopatológicas

Os aspectos histopatológicos do líquen plano são característicos, mas podem não ser específicos, porque outras condições, como as reações liquenóides

a drogas, também podem mostrar padrões semelhantes. Graus variáveis de ortoceratose e paraceratose podem estar presentes na superfície do epitélio, dependendo de a amostra de biópsia ter sido retirada de uma lesão erosiva ou reticular.

A espessura da camada espinhosa também pode variar. As cristas interpapilares podem estar ausentes ou hiperplásicas, mas classicamente são pontudas ou em forma de “dente de serra”.

A destruição da camada de células basais do epitélio é evidente e vem acompanhada por um infiltrado intenso e semelhante a uma faixa, principalmente de linfócitos T, imediatamente subjacente ao epitélio. Ceratinócitos degenerados podem ser vistos na área da interface epitélio-tecido conjuntivo, sendo chamados *corpos de Civatte, colóides, citóides ou hialinos*. Quando de uma infecção sobreposta por cândida, após o tratamento, as lesões devem ser reavaliadas histopatologicamente.

Tratamento e Prognóstico

O líquen plano reticular não produz sintomas e nenhum tratamento é necessário. Ocasionalmente poderá haver uma infecção sobreposta por cândida ocasionando uma sensação de queimação da mucosa oral. Nestes casos, a terapia antifúngica é necessária. Alguns investigadores recomendam reavaliação anual das lesões reticulares do líquen plano oral.

O líquen plano erosivo produz ferimentos abertos na boca e, por ser uma condição mediada imunologicamente, os corticosteróides são recomendados. As lesões respondem ao uso de corticosteróides sistêmicos, mas esta terapia drástica geralmente não é necessária. Um corticosteróide tópico, aplicado diversas vezes ao dia nas áreas mais sintomáticas, geralmente é suficiente para induzir à cura. O

paciente deve ser avisado que a condição, sem dúvida, irá voltar, devendo os corticosteróides ser reaplicados. Alguns investigadores sugerem que os pacientes devam ser avaliados a cada 3 meses, particularmente se as lesões não forem típicas.

A questão do potencial de malignidade do líquen plano, particularmente da forma erosiva, ainda está em discussão. A maioria dos casos relatados possui documentação escassa. Alguns destes casos podem não ter sido líquens planos verdadeiros mas, na verdade, leucoplasias displásicas com um infiltrado inflamatório liquenóide secundário que imitava o líquen plano. Além disso, pode haver o argumento de que o líquen plano e o carcinoma de células escamosas não são raros, algumas pessoas podem ter os dois problemas simultaneamente, e os dois processos podem não estar relacionados um com o outro. Por outro lado, alguns investigadores dizem que o epitélio atrófico do líquen plano pode ser mais suscetível à ação de carcinógenos, resultando em um risco maior de transformação maligna. Se o potencial maligno existe, parece ser pequeno e limitado a pacientes com a forma erosiva do líquen plano

6. Leucoplasia

A leucoplasia oral é definida pela Organização Mundial de Saúde como “uma placa ou mancha branca que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como qualquer outra doença”. O termo é estritamente clínico e não implica uma alteração histopatológica específica do tecido. O diagnóstico não depende da aparência da lesão, mas sim da exclusão de outras lesões. O líquen plano, o morsicatio (mordida de bochecha crônica), a ceratose friccional, a ceratose da bolsa de tabaco, a estomatite da nicotina, o leucoedema e o nevo esponjoso

branco devem ser descartados antes que um diagnóstico clínico de leucoplasia seja feito.

Afeta qualquer área da mucosa bucal, adulta, a partir da 4ª década de vida, principalmente no sexo masculino, exceto em populações regionais em que as mulheres consomem mais produtos de tabaco que os homens. A idade média dos indivíduos afetados – 60 anos – é semelhante à idade média dos pacientes com câncer oral. A causa da leucoplasia permanece desconhecida. O hábito de fumar parece ser o mais provável fator para o desenvolvimento da lesão (mais de 80% dos pacientes são fumantes). O álcool, apesar do efeito sinérgico com o tabaco em relação à produção do câncer oral, não tem sido associado à leucoplasia. A radiação ultravioleta é aceita como um fator etiológico para a leucoplasia do vermelhão do lábio inferior. E, vários microorganismos têm sido implicados na etiologia da leucoplasia como o *Treponema pallidum*, que na fase terciária da sífilis, mostra uma língua rígida com leucoplasia dorsal extensa; a *Candida albicans*, que coloniza as células superficiais paraceratinizadas produzindo uma placa granular e espessa, cuja coloração é uma mistura de branco e vermelho. O HPV, nos subtipos HPV 16 e HPV 18, tem sido identificado em algumas leucoplasias orais, porém também em células epiteliais normais. E, a irritação mecânica crônica pode produzir uma lesão semelhante à leucoplasia porém, prontamente reversível após a eliminação do trauma.

Características Clínicas

Apresenta-se como lesão branca, plana ou elevada, podendo ser fissurada, áspera ou lisa, de qualquer tamanho. Pode estar ulcerada, com duração variável. Não pode ser removida por raspagem simples. É considerada uma lesão pré-cancerígena ou pré-maligna. É a lesão crônica da mucosa oral mais comum, afetando 3% dos adultos brancos. Aproximadamente 70% das leucoplasias orais

são encontradas no vermelhão dos lábios, mucosa jugal e gengiva. Entretanto, as lesões na língua, vermelhão dos lábios e assoalho oral somam mais de 90% daquelas que indicam displasia ou carcinoma.

Leucoplasia Delgada – não mostra evidência de displasia e pode desaparecer ou permanecer imutável.

Leucoplasia Espessa ou Homogênea – a maioria permanece indefinidamente neste estágio. Algumas regridem ou desaparecem, e poucas tornam-se mais graves.

Leucoplasia Nodular ou Granular – quando desenvolvem irregularidades superficiais. Algumas tornam-se exofíticas e apresentam projeções agudas sendo chamadas de Leucoplasia Verruciforme ou Verrucosa.

Uma forma especial descrita recentemente, a Leucoplasia Verrucosa Proliferativa, com projeções superficiais ásperas difere das demais lesões leucoplásicas por apresentar crescimento persistente, eventualmente tornando-se de natureza exofítica e verrucosa. Diante de uma progressão, podem não ser distinguidas do carcinoma verrucoso e, posteriormente desenvolvem mudanças e se transformam em carcinoma de células escamosas. Mesmo com terapia, raramente regridem. É rara entre as variações de leucoplasia ao ter uma forte predileção pelo sexo feminino (razão homem-mulher de 1:4).

A leucoplasia pode tornar-se displásica, mesmo invasiva, sem nenhuma modificação em sua aparência clínica, mas algumas lesões apresentam placas avermelhadas espalhadas, chamadas eritroplasia. Tais áreas normalmente apresentam células tão imaturas que não podem produzir ceratina. Estas lesões com mistura de branco e vermelho, chamada eritroleucoplasia ou leucoplasia salpicada, representam um padrão de leucoplasia particularmente suscetível à transformação maligna.

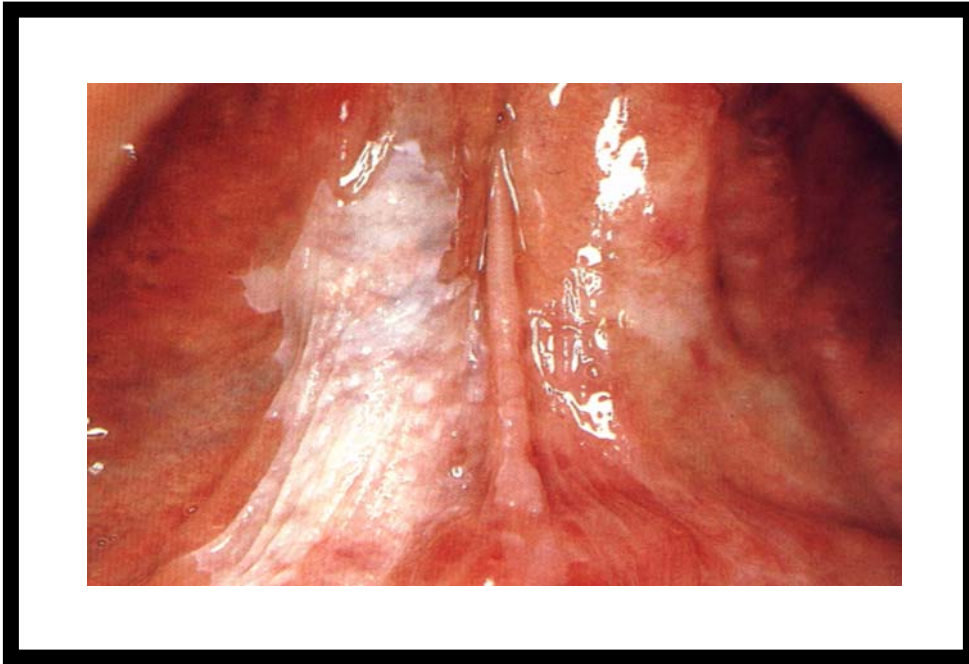


Fig. 9 – Leucoplasia em ventre lingual(Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento)¹⁰²

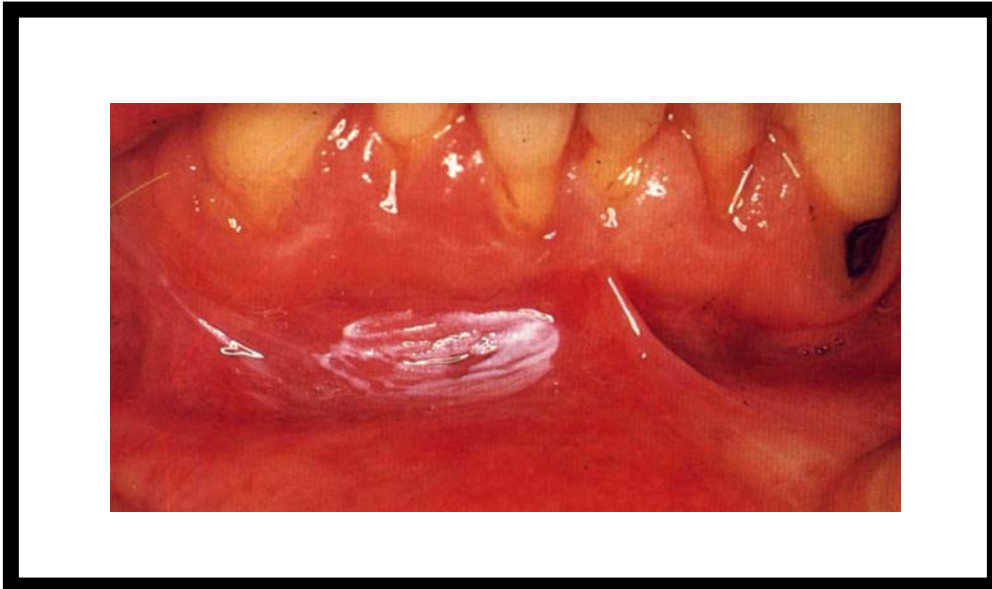


Fig. 10 – Leucoplasia em rebordo alveolar(Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento)¹⁰²

Características Histopatológicas

É caracterizada por uma camada de ceratose mais espessa no epitélio superficial (hiperceratose) e/ou uma camada espinhosa mais espessa (acantose).

Algumas lesões apresentam hiperqueratose superficial, mas mostram a atrofia ou adelgaçamento do epitélio subjacente. Frequentemente, células inflamatórias crônicas são percebidas dentro do tecido conjuntivo subjacente.

Tratamento e Prognóstico

Leucoplasia é um termo clínico e, portanto, há a necessidade de um diagnóstico histopatológico definitivo. Por isso, uma biópsia é realizada e o tecido deve ser retirado das áreas mais comprometidas clinicamente. Múltiplas biópsias de lesões grandes podem ser necessárias.

A leucoplasia exibindo displasia moderada ou marcante exige uma completa destruição ou remoção, se possível. Com relação a lesões menos graves, o tamanho da lesão e a resposta à medidas mais conservadoras, como parar de fumar, é que definirá a conduta.

A recorrência e novas lesões são frequentes sendo necessário um acompanhamento prolongado.

A leucoplasia sem displasia não necessita remoção porém, deve ser avaliada clinicamente a cada 6 meses. Novas biópsias são recomendadas caso persista o fumo ou haja mudanças clínicas. Estas lesões, com até displasia mínima, podem desaparecer em 3 meses caso cesse o hábito de fumar.

7.Eritroplasia

Também definida como uma placa vermelha que não pode ser diagnosticada clínica ou patologicamente como qualquer outra condição.

Quase todas as eritroplasias mostram displasia significativa, carcinoma *in situ* ou carcinoma de células escamosas invasivo. A causa é desconhecida, mas se presume que seja a mesma do carcinoma de células escamosas oral.

É menos freqüente que a leucoplasia, porém há um potencial maior de descoberta, na biópsia, de displasia significativa ou de malignidade invasiva.

Características Clínicas

É uma doença de homens mais velhos (pico de prevalência entre 65 – 74 anos). O assoalho de boca, a língua e o palato mole são os locais mais comuns de envolvimento, e lesões múltiplas podem estar presentes.

A mucosa alterada apresenta-se como uma mácula ou placa eritematosa bem demarcada, com uma textura macia e aveludada. É normalmente assintomática e pode estar associada a uma leucoplasia adjacente. A mucosite, candidíase ou lesões vasculares podem imitar clinicamente a eritroplasia, sendo necessário a biópsia para distinguí-las.

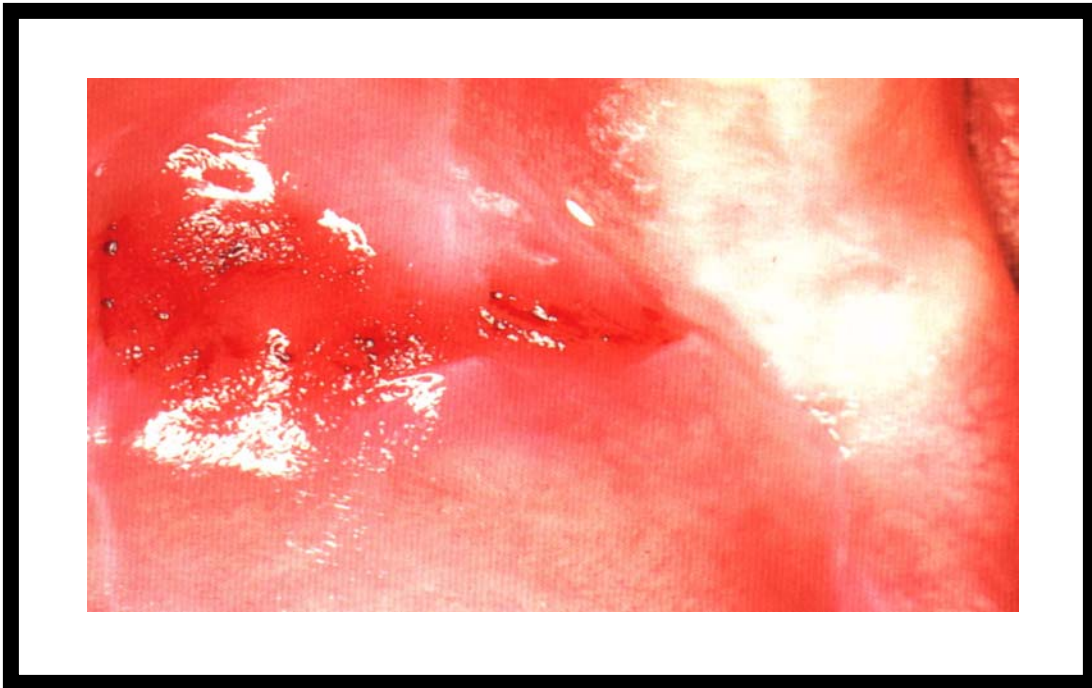


Fig. 11 - Eritroplasia (Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento) ¹⁰²

Características Histopatológicas

A maioria das eritroplasias (90%) representam histopatologicamente a displasia epitelial grave, carcinoma *in situ* ou carcinoma de células escamosas

superficialmente invasivo. O epitélio mostra ausência de produção de ceratina e, é freqüentemente atrófico, mas pode ser hiperplásico. Esta falta de ceratinização faz com que a microvasculatura se mostre dando assim a coloração avermelhada.

Tratamento e Prognóstico

Biópsia deve ser realizada, principalmente se a lesão localiza-se no assoalho da boca, no ventre ou bordo lateral da língua. Se houver alguma fonte de irritação, a mesma deve ser removida e a biópsia pode ser retardada por 2 semanas para que haja tempo para a regressão da lesão inflamatória.

A recorrência da lesão eritoplásica e o envolvimento multifocal da mucosa oral são comuns, necessitando acompanhamento a longo prazo.

8.Carcinoma Verrucoso

É uma variação de baixo grau do carcinoma de células escamosas oral. Foi primeiramente associado ao cuspo de tabaco. Atualmente tem sido diagnosticado em vários locais extra-orais, incluindo a mucosa da laringe, vagina e reto, bem como a pele dos seios, axilas, canal do ouvido e sola dos pés. O tumores em outros locais anatômicos, além da boca, aparentemente são relacionados ao uso de tabaco. Vários investigadores identificaram os subtipos de HPV 16 e 18 no carcinoma verrucoso oral, mas a importância disso não é clara.

O carcinoma verrucoso representa de 1 a 10% dos carcinomas de células escamosas orais, dependendo da popularidade local do uso do cuspo de tabaco.

A maioria dos carcinomas verrucosos surge na mucosa oral de pessoas que mascam ou inalam tabaco de forma crônica, tipicamente em áreas onde o tabaco costuma ser colocado. Vinte por cento das lesões orais são diagnosticadas em não-

usuários, mas a prática comum dos pacientes de negar o hábito do uso de tabaco dificulta um relatório de situação exata.

Características Clínicas

Freqüente em idade avançada (média entre 65 a 70 anos). Mais comum no sexo masculino e caracteriza-se por crescimento exofítico (projeções superficiais papilares ou verruciformes confundidas no passado com papilomatose oral florida), branco mas também podendo parecer eritematosas ou rosa dependendo da quantidade de ceratina produzida e do grau de resposta inflamatória do hospedeiro ao tumor, em couve-flor. Os pacientes usualmente são mascadores de tabaco. Os locais mais comuns de envolvimento da mucosa oral incluem o vestíbulo mandibular, a mucosa jugal e o palato duro. O local de ocorrência freqüentemente corresponde ao local de colocação crônica de tabaco.

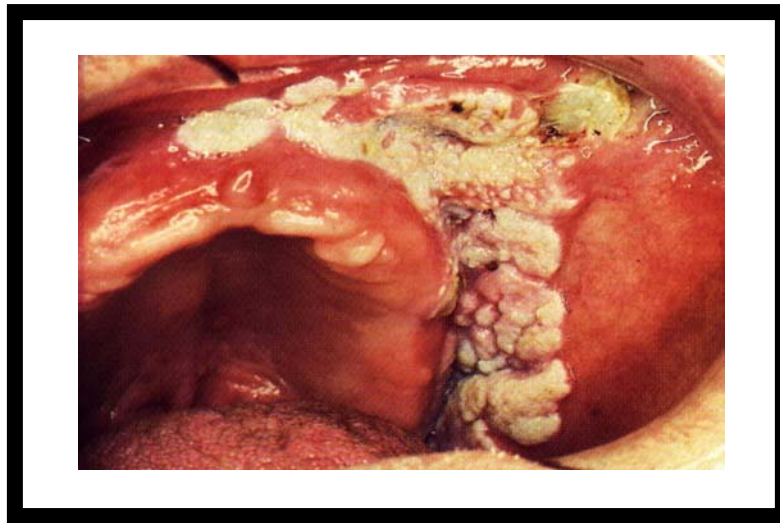


Fig. 12 – Carcinoma Verrucoso(Patologia Oral & Maxilofacial)¹⁹

Características Histopatológicas

Tem uma aparência microscópica enganosamente benigna. É caracterizado por cristas interpapilares largas e alongadas, que parecem “empurrar” para dentro do tecido conjuntivo adjacente. As lesões geralmente apresentam produção

abundante de ceratina e uma superfície papilar ou verruciforme. As células epiteliais lesionais geralmente mostram um padrão de maturação normal com nenhum grau significativo de atipia celular. Frequentemente há um intenso infiltrado de células inflamatórias crônicas no tecido conjuntivo adjacente.

O diagnóstico histopatológico requer uma biópsia incisional adequada. Como as células individuais não são muito displásicas, a configuração histopatológica geral deve ser avaliada para um diagnóstico apropriado. Uma retirada de amostra adequada também é importante, pois 20% destas lesões podem ter um carcinoma de células escamosas concomitantemente dentro do carcinoma verrucoso.

Tratamento e Prognóstico

A metástase é extremamente rara no carcinoma verrucoso possibilitando uma excisão cirúrgica sem dissecação radical do pescoço. A cirurgia geralmente não precisa ser tão extensiva quanto para um carcinoma de células escamosas. Com este tratamento, 90% dos pacientes estão livres da doença após 5 anos, embora 8% precisem de pelo menos um procedimento cirúrgico adicional durante tal período. O fracasso ocorre em pacientes com um envolvimento mais amplo ou naqueles incapazes de tolerar uma cirurgia extensiva devido a doenças sistêmicas não-relacionadas. Outra causa de fracasso é a inabilidade inicial de identificar um carcinoma de células escamosas surgindo dentro da lesão menos agressiva. A radioterapia é efetiva mas tem diminuído de popularidade devido aos relatórios publicados informando o desenvolvimento de carcinomas pobremente diferenciados ou anaplásicos dentro da lesão após radioterapia. A quimioterapia reduz temporariamente o tamanho da lesão mas não é um tratamento definitivo.

9. Carcinoma de Células Escamosas

Localiza-se em qualquer parte da boca, usualmente no lábio inferior, língua, assoalho de boca e bochecha. Mais freqüente da 4ª década de vida em diante. Predomina no sexo masculino. Cerca de 60% se apresenta como uma úlcera solitária, endurecida, de longa duração, e, 4% a 6%, como mancha branca, podendo ser plana, elevada ou fissurada. Fatores extrínsecos e intrínsecos atuam promovendo o desenvolvimento do carcinoma. É provável que mais de um fator seja necessário para produzir a malignidade. Vírus oncogênicos, e atualmente o HPV é o único que ainda parece estar implicado não somente nas lesões orais mas também nos carcinomas de tonsilas faríngeas, laringe, esôfago, colo uterino, vulva e pênis. Os subtipos HPV 16, 18, 31 e 33 são as cepas mais fortemente associadas à displasia e ao carcinoma de células escamosas.

É freqüente a ajuda profissional ser procurada 4 a 8 meses após o aparecimento da lesão (8 a 24 meses em grupos sócio-econômicos baixos). Na fase inicial de crescimento a dor é mínima.

Características Clínicas

A apresentação clínica é variada:

exofítica (formadora de massa);

endofítica (com ulceração);

leucoplásica (placa branca);

eritroplásica (placa vermelha) ou *eritroleucoplasia*.

Os exemplos leucoplásicos e eritroleucoplásicos são provavelmente casos em estágio inicial que ainda não produziram massa ou ulceração, e os aspectos clínicos são idênticos àqueles descritos para as lesões pré-malignas leucoplásicas e eritroplásicas. As mudanças de superfície são devidas à destruição da mucosa pelo desenvolvimento do carcinoma.

Uma lesão exofítica tipicamente tem uma superfície irregular ou papilar, e uma cor que pode ser normal, vermelha ou branca, dependendo da quantidade de ceratina produzida. A superfície é freqüentemente ulcerada, e o tumor é duro ao toque.

Os carcinomas endofíticos tipicamente têm uma área central ulcerada, de forma irregular e deprimida, com uma borda circundante “enrolada” de mucosa normal, vermelha ou branca. A borda enrolada resulta da invasão para baixo e lateralmente do tumor no epitélio adjacente. Esta aparência não é única para o carcinoma oral. Lesões granulomatosas como as infecções fúngicas profundas, tuberculose, sífilis terciária, lesões orais da doença de Crohn e úlceras traumáticas crônicas podem ser semelhantes. Havendo destruição do osso subjacente, a imagem radiográfica é de radiotransparência “roída por traças”, com margens rotas e mal definidas, semelhante a osteomielite.

O carcinoma do vermelhão dos lábios ocorre mais freqüentemente em pessoas que trabalham ao ar livre, Raramente é visto em pessoas com pigmentação escura da pele. Ocorrem mais no lábio inferior. Mostra-se como uma ulceração endurecida, rígida, exsudativa e com crosta. Taxa de crescimento tumoral é lenta o que faz com que os pacientes levem de 12 a 16 meses a tomarem conhecimento da lesão e terem um diagnóstico formal. As metástases são tardias e menos de 2% dos indivíduos têm envolvimento ganglionar presente no diagnóstico.

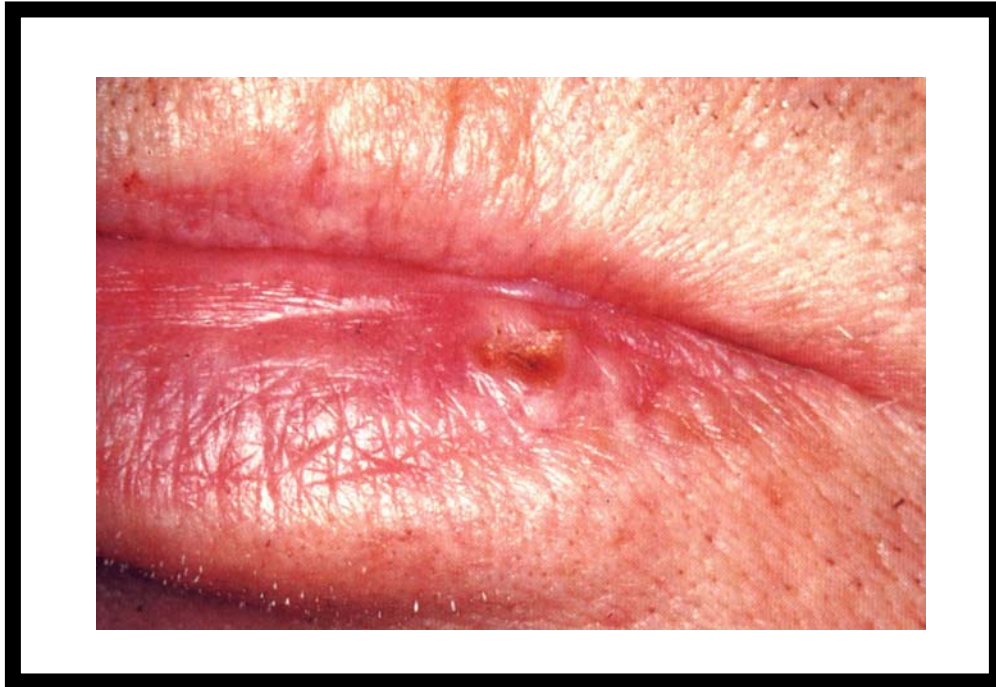


Fig. 13 – Carcinoma Labial(Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento)¹⁰²

No carcinoma intra-oral, o envolvimento da língua é de mais de 50%, afetando normalmente a superfície posterior lateral e ventral. Outros locais de envolvimento em ordem decrescente de frequência são assoalho de boca, palato mole, gengiva, mucosa jugal, mucosa labial e palato duro.

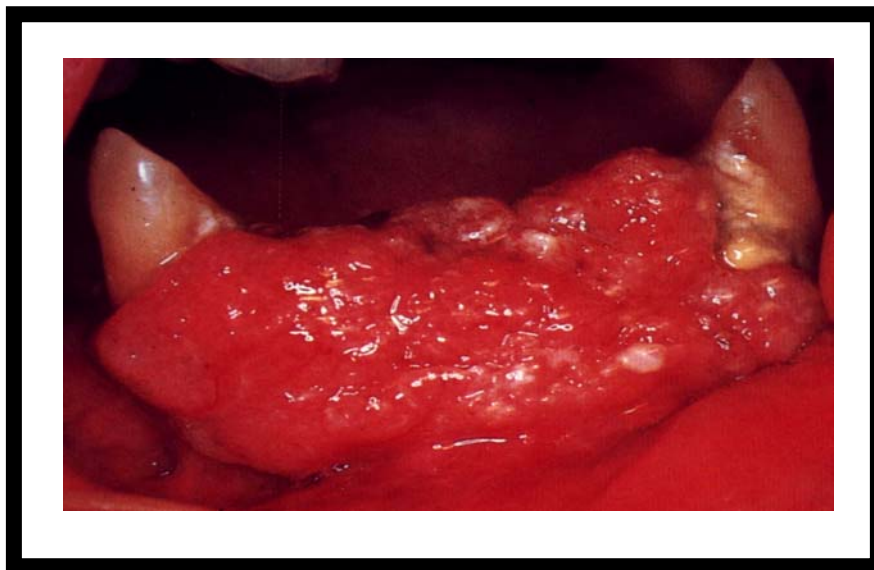


Fig. 14 – Carcinoma Gengival(Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento)¹⁰²

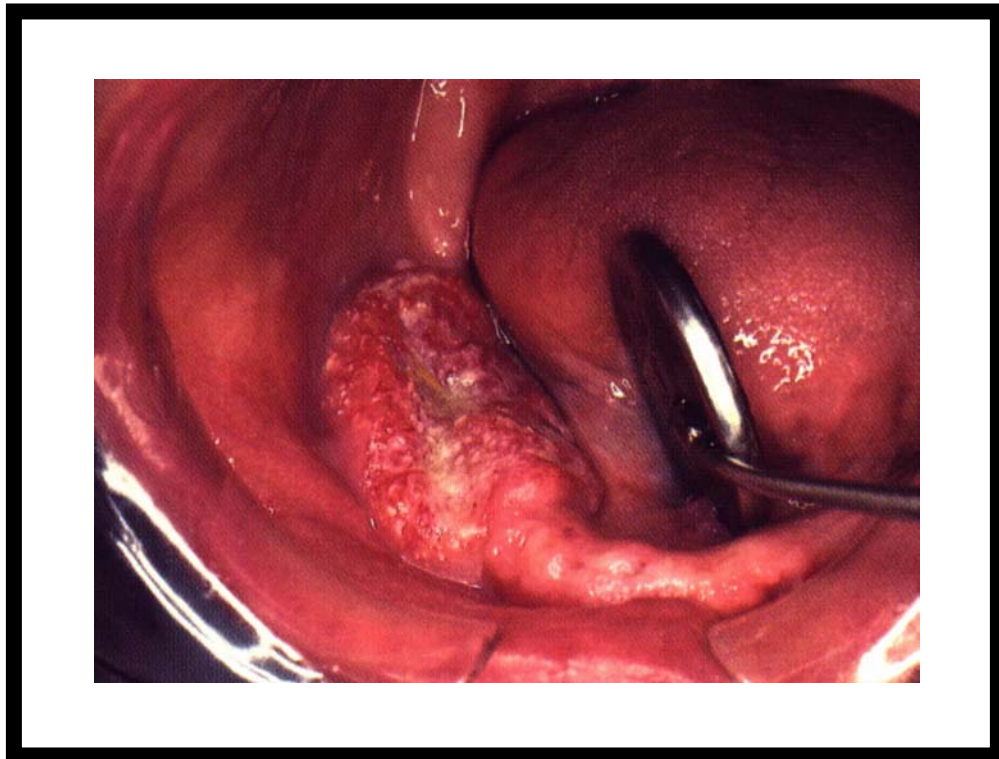


Fig. 15 – Carcinoma em rebordo alveolar(Patologia Oral & Maxilofacial)¹⁹

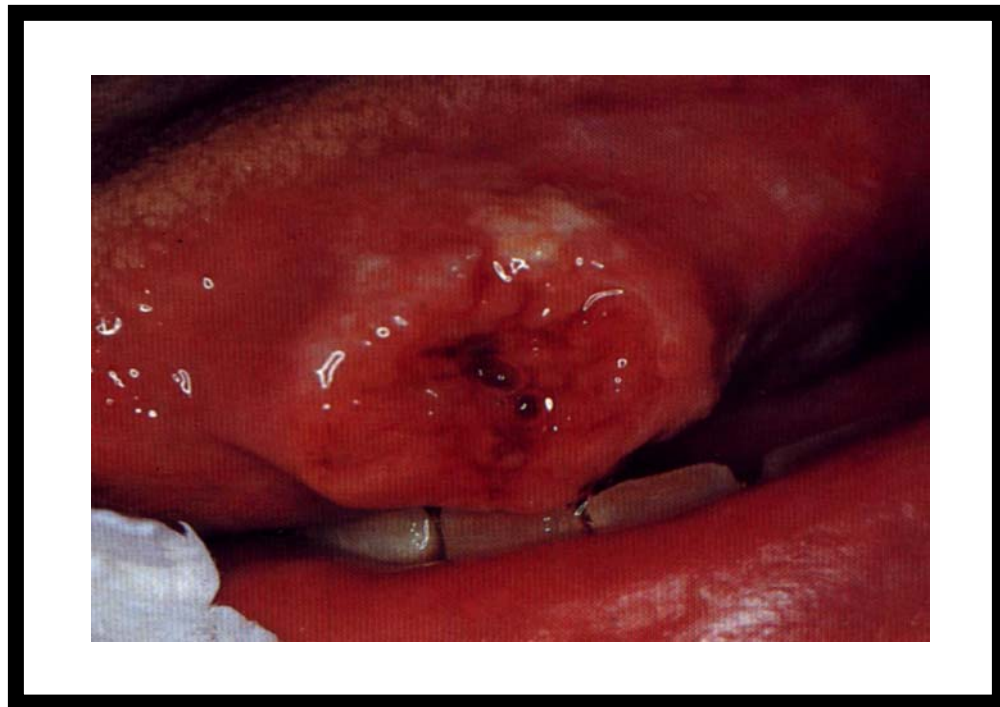


Fig. 16 – Carcinoma em Língua(Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento) ¹⁰²

Características Histopatológicas

É caracterizado por ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas que mostram diferenciação em direção a uma morfologia escamosa.

Tanto nos tumores superficiais quanto nos profundamente invasivos, as células lesionais geralmente apresentam abundância de citoplasma com núcleos grandes e um aumento da razão núcleo-citoplasma. O produto normal do epitélio escamoso é a ceratina, e “pérolas de ceratina” são produzidas por ilhas do epitélio escamoso, que amadurecem para formar um foco redondo e localizado de ceratina.

O diagnóstico é quase sempre feito com o microscópio. Exames especiais que utilizam anticorpos monoclonais podem ajudar a distinguir os carcinomas de células escamosas alto grau ou pobremente diferenciados de outras malignidades.

Tratamento e Prognóstico

O tratamento é guiado pelo estágio clínico da doença e consiste de ampla excisão cirúrgica, radioterapia, ou uma combinação de ambos. As lesões orofaríngeas normalmente recebem radioterapia. Agentes quimioterápicos são utilizados como terapia complementar; alguns reduzem o tamanho da massa tumoral, mas nenhum aumentou a taxa de sobrevivência significativamente.

Os carcinomas do vermelhão do lábio são tratados cirurgicamente e os resultados são excelentes. Os carcinomas que atingem o lábio superior parecem ter um comportamento biológico diferente daquele do lábio inferior. A taxa de sobrevivência de cinco anos é menor e há uma recorrência maior das lesões. Felizmente, são menos comuns que os carcinomas de lábio inferior.

O prognóstico de sobrevivência depende do estágio do tumor e diminui conforme aumenta o comprometimento ganglionar.

OBJETIVO GERAL

- Identificar a frequência de HPV em lesões da cavidade bucal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a frequência de HPV em indivíduos com lesões epiteliais da cavidade bucal que buscam atendimento no ambulatório de Estomatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
- Identificar o genótipo nas lesões onde o HPV esteja presente;
- Relacionar os achados relativos ao HPV – DNA com variáveis demográficas, sócio-econômicas, práticas sexuais, tabagismo, consumo de álcool.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod* 1996; 82: 57-68.
2. Lakshmi S, Asha Nair S, Radhakrishna Pillai M. Oral cancer and human papillomaviruses: is there a link?. *Journal of Surgical Oncology* 1993;52:193-96.
3. Chang F, Syrjänen S, Nuutinen J, Kärjä J, Syrjänen K. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Dermatol Res* 1990;282(8):493-7.
4. Maitland NJ, Cox MF, Lynas C, Prime SS, Meanwell CA, Scully C. Detection of human papillomavirus DNA in biopsies of human oral tissue. *Br J Cancer* 1987;56:245-50.
5. Costa LJ, Silveira FRX, Batista JM, Birman EG. Human Papilloma Virus - Its association with Epithelial Proliferative Lesions. *Braz Dent J* 1994;5(1):5-10.
6. Perrone, M et al. Papilloma Vírus Humanos: asociación con ciertas lesiones de la cavidad bucal. *Acta Odontol Venezol* 1992; vol 30, nº 1 e nº 2.
7. Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations oral disease. *J Oral Pathol Med* 1991;20:305-17.
8. Casnati BE, Guerrero A, Hornos C, Guerra MJ. Valoración clínica de las lesiones bucales y genitales en pacientes portadores de Papiloma Virus Humano (HPV). *Odontologia Uruguaia* 1999;47(1):3-8.

9. Parise Jr O. Câncer de Boca - aspectos básicos e terapêuticos. (1a. ed.) São Paulo: Sarvier Editora de Livros Médicos Ltda., 2000.
10. Bustos DA, Pavan JV, Carricart SE, et al. Detección del virus papiloma humano en lesiones cancerosas orales en la ciudad de Córdoba. Rev Fac Cienc Med Córdoba 1999;56(1):65-71.
11. Sand L, Jalouli J, Larsson PA, Hirsch JM. Human papilloma viruses in oral lesions. Anticancer Res 2000;20(2B):1183-8.
12. Zakrzewska J. Oral cancer. BMJ 1999;318:1051-54.
13. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. Oral Diseases 2000;6:65-74.
14. Holladay EB, Gerald WL. Viral gene detection in oral neoplasmas using the polymerase chain reaction. Am J Clin Pathol 1993;100:36-40.
15. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. Oral Oncology 1997;33(5):302-12.
16. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. Journal of Dental Education 2001;65(4):328-39.
17. Sugerman PB, Shillitoe EJ. The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. Oral Diseases 1997;3:130-47.
18. Park, N., Kang M. Genetic instability and oral cancer. EJB Electronic Journal of Biotechnology (on line) 2000;3(1):66-71.
19. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral & Maxilofacial. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998.
20. Soares CP. Papilomavírus Humano (HPV) - Um estudo de revisão. Rev Ciênc Farm 1999;20(1):11-34.

21. INCa MdS. Instituto Nacional do Câncer (INCa). <http://www.inca.gov.br> .
22. DATASUS(SIM) MdS. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM). <http://tabnet.datasus.gov.br> .
23. Gassenmaier A, Hornstein OP. Presence of human papillomavirus DNA in benign and precancerous oral leukoplakias and squamous cell carcinomas. *Dermatologica* 1988;176:224-33.
24. Epstein JB, Scully C. Assessing the patient at risk for oral squamous cell carcinoma. *Special Care Dentist* 1997;17(4):120-8.
25. Ogden GR, Wight AJ. Aetiology of oral cancer: alcohol. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 1998;36:247-51.
26. Feldman JG, Hasan M, Nagarajan M, Kissin B. A case control investigation of alcohol, tobacco and diet in head and neck cancer. *Prev Med* 1975;4:444-63.
27. Bross IDJ, Coombs J. Early onset of oral cancer among women who drink and smoke. *Oncology* 1976;33:136-9.
28. Hart AKE, Karakla DW, Pitman KT, Adams JF. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a report on 13 cases and review of the literature. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120:828-33.
29. Yeudall WA, Campos MS. Human papillomavirus DNA in biopsies of oral tissues. *J Gen Virol* 1991;72:173-6.
30. Zheng T, Boyle P, Hu HF, al. e. Tobacco smoking, alcohol and risk of oral cancer: a case-control study in Beijing, People's Republic of China. *Cancer Causes Control* 1990a;1:173-9.
31. D'Costa J, Saranath D, Dedhia P, Sanghvi V, Mehta AR. Detection of HPV-16 genoma in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. *Oral Oncology* 1998;34(5):413-20.

32. Franceschi S, Talamini R, Barra S, et al. Smoking and drinking in relation to cancers of the oral cavity, pharynx, larynx, and esophagus in northern Italy. *Cancer Research* 1990;50:6502-07.
33. Kato I, Nomura AM. Alcohol in the aetiology of upper aero-digestive tract cancer. *Eur J Cancer Oral Oncol* 1994;30B:75-81.
34. Demetrick DJ, Inoue M, Lester WM, Kingma I, Duggan MA, Paul LC. Human papillomavirus type 16 associated with oral squamous carcinoma in a cardiac transplant recipient. *Cancer* 1990;66(8):1726-31.
35. Zhang L, Epstein JB, Poh CF et al. Comparison of HPV infection, p53 mutation and allelic losses in post-transplant and non-posttransplant oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2002; 31:134-41.
36. Parra B, Slots J. Detección de human viruses in periodontal pockets using polymerase chain reaction. *Oral Microbiol Immunol* 1996;5:289-293.
37. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *International Journal of Cancer* 1989;43:992-1000.
38. Porro AM. Detecção e tipagem do papilomavírus humano em lesões cutâneas de verruga viral de pacientes infectados pelo HIV-1. [Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2000. 110 p.
39. McKaig R, Baric RS, Olshan AF. Human papillomavirus and head and neck cancer: epidemiology and molecular biology. *Head & Neck* 1998;20(3):250-65.
40. Fouret P, Martin F, Flahault A, Saint-Guily JL. Human papillomavirus infection in the malignant and premalignant head and neck epithelium. *Diagn Mol Pathol* 1995;4(2):122-7.

41. Nonnenmacher B. Resposta Humoral ao Papilomavírus Humano e sua Correlação com o Risco de Neoplasia Cervical em Mulheres Submetidas à Rastreamento para Câncer de Colo Uterino na Liga Feminina de Combate ao Câncer de Porto Alegre [Doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1999. 104 p.
42. Bonnez W, Reichman RC. Papillomaviruses. In: Mandell, Douglas and Bennett's ed. Principles and practice of infectious diseases. Fourth Edition ed. New York: Churchill Livingstone, 1995:1387-1400.
43. De Palo G, Stephanon B, Pilotti S. Infecção pelo papiloma vírus. In: De Palo G, ed. Colposcopia e Patologia do Trato Genital Inferior. Rio de Janeiro: MEDSI - Editora Médica e Científica Ltda., 1993:133-88.
44. Severson J, Evans TY, Lee P, Chan T, Arany I, Tyring SK. Human papillomavirus infections: epidemiology, pathogenesis, and therapy. Journal of Cutaneous Medicine and Surgery: Incorporating Medical and Surgical Dermatology 2001; publicação online.
45. Völter C, He Y, Delius H, et al. Novel HPV types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. Int J Cancer 1996;66(4):453-6.
46. Garlick JA, Taichman LB. Human papillomavirus infection of the oral mucosa. Am J Dermatopathol 1991;13(4):386-95.
47. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjänen KJ. Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. J Oral Pathol Med 1992;21(10):459-64.
48. Syrjanen SM, Syrjanen KJ, Happonen RP. Human papillomavirus (HPV) DNA sequences in oral precancerous lesions and squamous cell carcinoma demonstrated by in situ hybridization. J Oral Pathol 1988;17(6):273-8.

49. Mao E-J. Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:320-9.
50. Kashima HK, Kutcher M, Kessis T, Levin LS, de Villiers EM, Shah K. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus, and clinically normal epithelium of the oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99:55-61.
51. Ward KA, Napier SS, Winter PC, Maw RD, Dinsmore WW. Detection of human papilloma virus DNA sequences in oral squamous cell papillomas by the polymerase chain reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:63-6.
52. Frazer IH, Leonard JH, Schonrock J, Wright RG, Kearsley JH. HPV DNA in oropharyngeal squamous cell cancers: comparison of results from four DNA detection methods. *Pathology* 1993;25:138-43.
53. Nielsen H, Norrild B, Vedtofte P, Praetorius F, Reibel J, Holmstrup P. Human papillomavirus in oral premalignant lesions. *Oral Oncol, Eur J Cancer* 1996;32B(4):264-270.
54. Villa LL. Biologia e imunologia dos papilomavírus humanos. In: Soares PRB, Bertuol M, et al. eds. *Infecções Clínico-Cirúrgicas em Ginecologia*. Porto Alegre: Editora Artes Médicas Sul Ltda., 1996:120-9.
55. Shroyer KR, Greer Jr RO. Detection of human papillomavirus DNA by in situ DNA hybridization and polymerase chain reaction in premalignant and malignant oral lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71(6):708-13.
56. Jacyneto C. et al. *Infecção genital feminina e masculina*. Livraria e Editora Revinter Ltda., 1994.

57. Premoli-de-Percoco G, et al. Focal epithelial hyperplasia: human-papilloma virus-induced disease with a genetic predisposition in a Venezuelan family. *Human Genet* 1993; 91:386-88.
58. Yoshpe NS. Oral and laryngeal papilloma: a pediatric manifestation of sexually transmitted disease? *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 1995;31:77-83.
59. Howley PM. Papillomavirinae and their replication. In: Fields BN, Knipe DM, et al. eds. *Virology*. 2ª edition ed. New York: Raven Press Ltda., 1990:1625-50.
60. Swygart C. Human papillomavirus: disease and laboratory diagnosis. *Br J Biomed Sci* 1997; 54:299-303.
61. Shah KV, Howley PM. Papillomaviruses. In: Fields BN, Knipe DM, et al. eds. *Virology*. 2ª edition ed. New York: Raven Press Ltda., 1990:1651-76.
62. Bozzetti MC. Infecção do Trato Genital pelo Papilomavírus Humano e Fatores de Risco em Mulheres que buscam Atendimento no Ambulatório de Ginecologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre [Doutorado]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1996. 192 p.
63. Maitland NJ, Bromidge T, Cox MF, Crane IJ, Prime SS, Scully C. Detection of human papillomavirus genes in human oral tissue biopsies and cultures by polymerase chain reaction. *Br J Cancer* 1989;59(5):698-703.
64. Lancaster WD, Sundberg JP. Characterization of papillomaviruses isolated from cutaneous fibromas of white-tailed deer and mule deer. *Virology* 1982; 123:212.
65. Ball E. Virus papiloma humano. *Biologia molecular, genética y mecanismo oncogênico*. *Derm Venez* 1998;37:136-41.

66. Peyton CL, Wheeler CM. Identification of five novel human papillomavirus sequences in the New Mexico triethnic population. *The Journal of Infectious Diseases* 1994;170:1089-92.
67. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994;170:1077-85.
68. De Villiers EM, Lavergne D, McLaren K, Benton EC. Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* 1997;73:356-61.
69. Ong CK, Bernard HU, Villa LL. Identification of genomic sequences of three novel human papillomavirus sequences in cervical smears of amazonian indians. *The Journal of Infectious Diseases* 1994;170:1086-88.
70. De Villiers EM. Human pathogenic papillomavirus types: an update. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 186:1-11.
71. Majewski S, Jablonska S. Human papillomavirus-associated tumors of the skin and mucosa. *J Am Acad Dermatol* 1997; 36:658-9.
72. Wieland U, Pfister H. Papilomavirus em patologia humana: epidemiologia, patogênese e papel oncogênico. In: Gross G, Barrasso R, eds. *Infeção por Papilomavírus Humano / Atlas Clínico de HPV*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999:1-18.
73. Chatterjee R, Mukhopadhyay D, Murmu N, Mitra PK. Correlation between human papillomavirus DNA detection in maternal cervical smears and buccal swabs of infants. *Indian Journal of Experimental Biology* 1998;36:199-202.
74. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Syrjänen KJ, Yliskoski M. Oral mucosal changes in women with genital HPV infection. *J Oral Pathol Med* 1990;19:142-8.

75. Carvalho JJM, Oyakawa N, eds. I Consenso Brasileiro de HPV - São Roque 1999. 1a. edição ed. São Paulo: BG Cultural, 2000.
76. Scully C, Prime S, Maitland N. Papillomaviruses: their possible role in oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60:166-174.
77. Campisi G, Margiotta V, Giovannelli I, Mancuso S, Ammatuna P. Presence of human papillomavirus (HPV) in normal oral epithelium of HIV+ and renal transplant patient. *HIV Dent* 2000; online: <http://www.hivdent.org/oralm/oralm2000pohpvinoe.htm>.
78. Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg* 1983;12:418-24.
79. Giraldo PC, Simões JA, Ribeiro Filho AD, Tambascia JK, Dias ALV, Pacello PCC. Avaliação citológica da orofaringe de mulheres portadoras do HPV genital. *Rev Bras Ginecol Obstet* 1996;18(9):737-42.
80. Badaracco G, Venuti A, Di Lonardo A, et al. Concurrent HPV infection in oral and genital mucosa. *J Oral Pathol Med* 1998;27(3):130-4.
81. Franceschi S, Munoz N, Bosch XF. Human papillomavirus and cancers of the upper aerodigestive tract: a review of epidemiological and experimental evidence. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* 1996;5(7):567-75.
82. Eversole LR, Stone CE, Beckman AM. Detection of EBV and HPV sequences in oral "hairy" leukoplakia by in situ hybridization. *J Med Virol* 1988;26(3):271-7.

83. Felix DH, Jalal H, Cubie HA, et al. Detection of Epstein-Barr virus and human papillomavirus type 16 DNA in hairy leukoplakia by in situ hybridization and the polymerase chain reaction. *J Oral Pathol Med* 1993; 22:277-81.
84. Beaudenon S, Praetorius F, Kremsdorf D, et al. A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia. *J Invest Dermatol* 1987;88(2):130-5.
85. Martínez LG, Ramírez LP, Ramírez AP. Papiloma bucal: estudio retrospectivo de 1963 a 1982. *Revista Médica, Instituto Mexicano del Seguro Social* 1986;24(2):117-20.
86. Greer Jr RO, Eversole LR, Crosby LK. Detection of human papillomavirus - genomic DNA in oral epithelial dysplasias, oral smokeless tobacco - associated leukoplakias, and epithelial malignancies. *J Oral Maxillofac Surg* 1990 1990;48:1201-05.
87. Adler-Storthz K, Ficarra G, Woods KV, Gaglioti D, DiPietro M, Shillitoe EJ. Prevalence of Epstein-Barr virus and human papillomavirus in oral mucosa of HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 1992;21(4):164-70.
88. D'Costa J, Saranath D, Dedhia P, Sanghvi V, Mehta AR. Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. *Oral Oncol* 1998;34(5):413-20.
89. Cao J, Zhang ZY, Patima., Zhang YX, Chen WT. Human papillomavirus infection and p53 alteration in oral squamous cell carcinoma. *Chin J Dent Res* 2000;3(3):44-9.
90. Shima K, Kobayashi I, Saito I, et al. Incidence of human papillomavirus 16 and 18 infection and p53 mutation in patients with oral squamous cell carcinoma in Japan. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2000;38(5):445-50.

91. Manos MM, Waldman J, Zhang TY, et al. Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomaviruses. *The Journal of Infectious Diseases* 1994;170:1096-99.
92. Meyer T, Arndt R, Christophers E, et al. Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *The Journal of Infectious Diseases* 1998;178:252-5.
93. Zahm DM, Nindl I, Schneider A. Princípios gerais do diagnóstico: detecção do papilomavírus humano. In: Gross G, Barrasso R, eds. *Infeção por Papilomavírus Humano / Atlas Clínico de HPV*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1999:21-45.
94. Soto Y, Muné M, Goicolea A, et al. Aplicación de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de secuencias de Papillomavirus humano. *Rev Cubana Med Trop* 1998;50(3):191-8.
95. Meisels A, Fortin R. Condylomatous lesions of the cervix and vagina – Cytologic Patterns. *Acta Cytologica* 1976; 20(6):505-509.
96. Newton CR, Graham A. *What is PCR? – PCR Oxford*, Bios Scientific Publishers 1994; p.1-7.
97. Silva EM, Silveira AMM, Neuvald LR, Silva MAGS, Guimarães MCM, Sonohara MK. Técnicas atuais para o diagnóstico das doenças virais na mucosa bucal. *Robrac* 1996;6(18):9-12.
98. Rodu B. New approaches to the diagnosis of oral soft-tissue disease of viral origin. *Adv Dent Res* 1993;7(2):207-12.
99. Bauer HM, Ting Y, Greer CE, et al. Genital human papillomavirus infection in female university students as determined by a PCR-based method. *JAMA* 1991;265(4):472-77.

100. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky S, M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209-14.
101. Trofatter KEJ. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am J Med* 1997; 102:21-27.
102. Scully C, Flint SR, Porter SR. *Atlas Colorido de Doenças da Boca – Diagnóstico e Tratamento.* (2^a. ed.) Rio de Janeiro: Revinter, 1996.

ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS

PAPILLOMAVIRUS HUMAN FREQUENCY IN ORAL LESIONS

Abstract

The polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the human papillomavirus (HPV) in smears of oral epithelial lesions of 112 patients, and of these, 88 samples were shown to be adequate to perform the PCR for β -globin. For the amplification of HPV-DNA primers consensus MY09/MY11 were used and later, the specific types were identified for analysis of polymorphisms for enzymatic restriction. The HPV genome was present in 11.3% of the samples. The types 6b, MM4 (W13B) and MM9 (PAP238A) were identified.

Key words – human papillomavirus; HPV; oral lesion; polymerase chain reaction; PCR; epidemiology.

Financial support – This work was funded by FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre and FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

This study was approved by the Hospital de Clínicas de Porto Alegre ethical committee.

Introduction

The Human Papillomaviruses (HPV) are a group of DNA oncogenic viruses that have been associated in the genesis of various human tumors, particularly squamous tumors of the cervix, the anogenital region, the skin and the upper digestive and respiratory tracts⁽¹⁾. These viruses are epitheliotropic and there are

more than 120 types, and just over 80 of them clearly identified^(2,3). These viruses are associated with papillomatous, hyperplastic and verrucous lesions in the skin and mucous of various sites⁽⁴⁾. In the oral cavity, the most common lesions are the squamous cell papilloma, the focal epithelial hyperplasia, the condyloma acuminatum, the verruca vulgaris, the lichen planus, the leukoplakias and the oral squamous cell carcinoma^(5,6).

The oral cavity is covered by an epithelium that has similar characteristics to the genital region and both are exposed to various estraneous bodies and microorganisms, some of which may be carcinogenic⁽¹⁾. Considering that in the genital region this virus is related to the development of cancer in the uterine cervix, it is possible that this link would also be present in relation to oral epithelial cancer. Therefore, it has become important to know the frequency of this virus in the oral cavity and also its possible relation to the presence of the malignant neoplasm in the region.

The frequency of HPV in oral lesions is extremely varied and this variation is related to the geographic area, the types of lesion and the method of diagnostic. Today, the PCR appears to be the most sensitive, rapid and less expensive method that can be easily applied to epidemiological studies⁽⁷⁾. The aim of this study is to identify the frequency of HPV in oral lesions in individuals that seek treatment in a referral service of a university hospital.

Material and Methods

A cross-sectional study was carried out in patients that were being attended in the Stomatology Unit of the Hospital de Clínicas of Porto Alegre, Federal University of Rio Grande do Sul, between March 2000 and May 2001. All the patients with clinical diagnostic for oral epithelial lesion and who had agreed to

participate in the study were investigated. A total of 112 patients fulfilled the criteria and were allocated in the study. Lesions of the epithelial type that showed clinically as exophytic and/or ulcerated and/or hyperplastic for trauma of prothesis or not, or type lichen planus or leukoplakias were considered. Biopsies were taken from the lesions with indication of total extraction or that needed a diagnostic definition.

Sample preparation and DNA extraction: oral specimens were collected through lesion smears with the aid of a cytobrush and immersed in phosphate saline solution (PBS). This material was frozen at -80° C for further DNA extraction. For this extraction the QIAamp DNA kit (QIAGEN- USA) was used, following the protocol indicated for body fluid. To verify the integrity of DNA extraction, all samples were submitted to the PCR technique for amplification β -globin (286 bp) through the primers PCO4 and GH20 and the samples β -globin positives were later processed with the objective of identifying HPV-DNA.

PCR and HPV typing: PCR was the method used for amplification and HPV-DNA detection using primers consensus L1 region (MY09 and MY11) that amplify a fragment of 450 bp, as described by Manos et al. ⁽⁸⁾. The samples were processed in duplicate and, in each reaction, positive controls for HPV and, negative controls (no DNA) were utilized, avoiding the production of false-positive by contamination.

The genotyping was performed through the polymorphic analysis method for enzymatic restriction of amplified product for PCR (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphisms) according to description by Bernard et al. ⁽⁹⁾, that included the identification of 41 mucosal HPV types. The enzymes used in this study for identifying genotypes were *BamHI*, *DdeI*, *HaeIII*, *HinfI*, *PstI* and *RsaI*.

Statistical Analysis

The frequency of HPV-DNA in oral lesions is described. The characteristics of the sample are compared among patients with positive and negative HPV lesions using the Mann-Whitney, Chi-squared (or Fisher's Exact when indicated) tests. The findings with $p \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

The material was collected from 112 individuals. Of these, 32 (28.6%) were excluded (8 for non histological confirmation of epithelial lesion and, 24 were negative for β -globin, or that is to say, without DNA or with inviable DNA for amplification. Of the 80 individuals that remained in the study, 58.7% (47/80) had biopsies made from their lesions. Among the biopsied lesions 2 carcinomatous, 4 squamous papilloma and 41 hyperplastic lesions with or without inflammatory process associated were found. Among the biopsied lesions, 5 were HPV+. The other lesions HPV+ were lichen planus, ulcerated lesion, gingival hyperplastic and leukoplakia.

The age range of the 80 selected patients was 11-86 years, 68.7% being females and 31.3% males. Eighteen point seven percent of the patients were black and no indigenous patients participated in the sample. The majority (70%) of the patients studied had received up to 8 years of schooling. In terms of occupation, 70.5% (55/78) had no qualified activity, 55.8% (43/77) received a total monthly family income of up to 3.99 minimum wages and 19.4% (15/77) received incomes in a range of 10 or more minimum wages.

Of the sample studied, 11.3% (9/80) showed positive HPV. Among individual positive HPV, the age range was between 24-68 years. The average age in this group was higher than in the negative HPV group (table 1). There was a

predominance of the female sex in both groups, being 66.7% among positive HPV and 69% among the negatives. The HPV positive patients were all caucasian. This predominance was not exclusive among HPV negative patients. In both groups, the majority had received up to 8 years of education and had no qualified occupation. The low family income also predominated in both groups, but the HPV positives showed a larger frequency of families with an income of or the equivalent of 10 minimum wages or above. None of these findings were statistically significant (table 1).

In relation to smokers the percentage was slightly higher among positive HPV patients. It is relevant to mention that HPV positive patients had smoked, on average, for less time and smoked less cigarettes than HPV negative patients. However, none of these differences were statistically significant. In relation to the consumption of alcohol, despite the frequency of this consumption being larger among HPV negatives, it was observed that in the HPV positive group the consumption of alcohol had been occurring for longer and that the consumption of distilled drinks was more frequent, but none of these findings showed statistical significance (table 2).

Also, there were no significant differences observed in relation to the comparison of the variables related to sexual behavior among positive and negative HPV groups (table 3).

Among the samples of HPV positives the genotypes HPV 6b in 2 samples and, HPV MM4 (W13B) and HPV MM9 (PAP238A) in another 2 samples were identified (figure 1).

Discussion

The aim of this study has been to investigate the presence of HPV-DNA in oral epithelial lesions of patients that seek treatment in a referral service for stomatology at a university hospital. The frequency of 11.3% of HPV positives observed in this study is among the vast range described in current literature (5% to 80%)⁽¹⁰⁻¹²⁾. One explanation for the wide variation of this frequency would be the differences of sensitivity and specificity in the methods used for detection of HPV in oral lesions⁽¹⁰⁻¹²⁾. Even within this range it could be said that the frequency showed in our study suggests a low prevalence of oral HPV infection in the population studied. The clinical aspects observed in oral lesion many times did not allow for the clear definition of the lesion type. Despite this, the biopsies occurred only when there was the necessity for total removal of the lesion or for diagnostic reasons. Kellokoski et al.⁽¹³⁾ mention a detection around 85% of DNA in biopsy samples by PCR. Our sample consisted of scrapings of an oral lesion using cytobrush and then of PCR and, our results, which indicate that 78.5% (88/112) of the samples were positive for β -globin, are not in disagreement with the current literature.

Among the lesions that were part of our samples, we observed 5.0% (4/80) squamous papilloma and 2.5% (2/80) of epidermoid carcinoma. The majority were hyperplastic lesions (51.3%; 41/80). In accordance with current literature, papillomatous lesions weren't common and in our results the rate is within the expected results, that is 1% to 4.6%(13). According to Ward et al.⁽¹⁴⁾, although the findings lead us to believe in a viral cause for the majority of squamous papillomas, it is impossible to confirm an etiologic role for HPV. It is worth mentioning that of the 4 papilloma lesions observed in this study and, confirmed for histologic tests, only one proved positive for HPV. The genotype of this lesion was HPV 6b⁽⁹⁾, and is in

accordance with current literature that proves that the types 6, 11 and 16 occur more frequently^(13, 15).

The focal epithelial hyperplasia is significantly more frequent among indigenous peoples and it is associated with HPV types 13 and 32⁽¹⁶⁾. However, despite the existence of indigenous communities in several regions of Brazil, including the southern region where this study was carried out, no indigenous people were observed in the study.

It is recognised that HPV plays a significant role in a series of lesions, particularly several verrucas, that indicates its significance in the etiology of premalignant lesions and malignant epithelial neoplasms, including whichever involve the oral mucous^(15, 17). However, no verruca vulgaris or condyloma acuminatum lesion was detected in the samples studied. The transmission of these two lesions is associated with self-inoculation or the practice of oral sex. In this sample, the report of the practice of oral sex was low, and that would explain the absence of the lesions in our findings, although, in most cases, this report does not reflect reality, according to Casnati et al.⁽⁴⁾

The genotypes identified in samples positive HPV were 6b, MM4 and MM9. The type HPV 6b has been described by many authors^(10, 14, 18, 19), and seems to be a common type observed in oral lesions. On the other hand, the types MM4 and MM9, considered high-risk types^(20, 21), were rarely described as present in buccal cavity lesions⁽²²⁾. In spite of it not being possible to identify all positive samples, we believe that these findings are very important.

In this study the patient that showed the genotype MM9 (now denominated HPV 73)⁽²⁰⁾ was a renal transplant patient, using immunosuppression and corticoid. The HPV seems to be related to, in a certain way, with the immunosuppression state of the host. There is an increase in the number of diagnostics of HPV in patients with

acquired immune deficiency syndrome, renal transplants, pregnancy or even diseases that require prolonged corticotherapy. It was observed that in these patients the evolutionary behaviour is more aggressive⁽²³⁾. Patients that receive immunosuppressor therapy after organ transplants have an increased risk of developing malignant tumors. The incidence of neoplasia in these patients is 100 times greater than that in non transplant patients, controlled by age effect. The cause for this increase in HPV incidence is still unclear, but perhaps it is due to a combination of a decrease of the detection of carcinogenic cells by the immune system, chronic antigenic stimulation for the transplanted organ, direct carcinogenic effects of immunosuppressive drugs or proliferation of the oncogenic virus⁽²⁴⁾.

No specific or preferential association exists between HPV types and a particular clinical oral lesion. Individuals that are immunocompromised develop lesions with unusual clinical appearance and, these lesions include HPV types not usually seen in oral lesions. The fact that immunosuppression is a predisposing factor for HPV-associated lesions suggests that immune regulation plays a role in the pathogenesis of these lesions⁽²⁵⁾. Another genotype uncommon in oral cavity was HPV MM4, also high-risk, found in lichen planus lesion. Recent evidence indicates that lichen planus is a mucocutaneous disturbance immunologically mediated⁽²⁶⁾.

The other two genotypes identified were HPV 6b found in a patient carrying sublingual squamous papilloma and, in another patient with leukoplakia in the anterior region of the mandible, who reported that he had had a malignant tumor removed from the mouth floor 10 years previously. In leukoplakias and mouth floor lesions, Chang et al.⁽¹⁷⁾ reported that the genotype more frequent is HPV 16 but, genotype HPV 6b, usually associated with benign lesions was found by their team in squamous cells carcinoma. This last case leads us to think of viral latency and the possibility of there being a reservoir for this virus in the oral cavity⁽²⁷⁾.

Our results increase the concept of infection for HPV types uncommon in immunocompromised patients and the possibility of viral latency or, the oral cavity to be a reservoir for this virus providing that it manifests itself before immunity alteration.

Bibliography

1. Lakshmi S, Asha Nair S, Radhakrishna Pillai M. Oral cancer and human papillomaviruses: is there a link?. *Journal of Surgical Oncology* 1993;52:193-96.
2. Porro AM. Detecção e tipagem do papilomavírus humano em lesões cutâneas de verruga viral de pacientes infectados pelo HIV-1. [Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2000. 110 p.
3. De Villiers EM, Lavergne D, McLaren K, Benton EC. Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* 1997;73:356-61.
4. Casnati BE, Guerrero A, Hornos C, Guerra MJ. Valoración clínica de las lesiones bucales y genitales en pacientes portadores de Papiloma Virus Humano (HPV). *Odontologia Uruguia* 1999;47(1):3-8.
5. Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations oral disease. *J Oral Pathol Med* 1991;20:305-17.
6. Mao E-J. Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:320-9.
7. Jimenez C, Correnti M, Salma N, Cavazza ME, Perrone M. Detection of human papillomavirus DNA in benign oral squamous epithelial lesions in Venezuela. *J Oral Pathol Med* 2001;30:385-8.
8. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky S, M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209-14.

9. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994;170:1077-85.
10. Völter C, He Y, Delius H, et al. Novel HPV types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. *Int J Cancer* 1996;66(4):453-6.
11. Kashima HK, Kutcher M, Kessis T, Levin LS, de Villiers EM, Shah K. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus, and clinically normal epithelium of the oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99:55-61.
12. Maitland NJ, Cox MF, Lynas C, Prime SS, Meanwell CA, Scully C. Detection of human papillomavirus DNA in biopsies of human oral tissue. *Br J Cancer* 1987;56:245-50.
13. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjänen KJ. Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med* 1992;21(10):459-64.
14. Ward KA, Napier SS, Winter PC, Maw RD, Dinsmore WW. Detection of human papilloma virus DNA sequences in oral squamous cell papillomas by the polymerase chain reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:63-6.
15. Scully C, Prime S, Maitland N. Papillomaviruses: their possible role in oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60:166-174.
16. Beaudenon S, Praetorius F, Kremsdorf D, et al. A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia. *J Invest Dermatol* 1987;88(2):130-5.

17. Chang F, Syrjänen S, Nuutinen J, Kärjä J, Syrjänen K. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Dermatol Res* 1990;282(8):493-7.
18. Costa LJ, Silveira FRX, Batista JM, Birman EG. Human Papiloma Virus - Its association with Epithelial Proliferative Lesions. *Braz Dent J* 1994;5(1):5-10.
19. Jontell M, Watts S, Wallström M, Levin L, Sloberg K. Human papilloma virus in erosive oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990;19(6):273-7.
20. Meyer T, Arndt R, Christophers E, et al. Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *The Journal of Infectious Diseases* 1998;178:252-5.
21. Manos MM, Waldman J, Zhang TY, et al. Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomaviruses. *The Journal of Infectious Diseases* 1994;170:1096-99.
22. Ball E. Virus papiloma humano. *Biologia molecular, genética y mecanismo oncogênico. Derm Venez* 1998;37:136-41.
23. Giraldo PC, Simões JA, Ribeiro Filho AD, Tambascia JK, Dias ALV, Pacello PCC. Avaliação citológica da orofaringe de mulheres portadoras do HPV genital. *Rev Bras Ginecol Obstet* 1996;18(9):737-42.
24. Demetrick DJ, Inoue M, Lester WM, Kingma I, Duggan MA, Paul LC. Human papillomavirus type 16 associated with oral squamous carcinoma in a cardiac transplant recipient. *Cancer* 1990;66(8):1726-31.
25. Garlick JA, Taichman LB. Human papillomavirus infection of the oral mucosa. *Am J Dermatopathol* 1991;13(4):386-95.
26. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998.

27. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Syrjänen KJ, Yliskoski M. Oral mucosal changes in women with genital HPV infection. *J Oral Pathol Med* 1990 1990;19:142-8.

Table 1. Distribution of demographic characteristics according to oral HPV status

VARIABLE	HPV POSITIVES	HPV NEGATIVES	p-value *
Age (years) mean ± sd	53,1 ± 15,2	47,8 ± 16,3	0,27**
Skin color			
White	100,0%	78,9%	0,19***
Non-white	0,0%	21,1%	
Schooling (years)			
≤ 8	66,7%	70,4%	0,54***
> 8	33,3%	29,6%	
Occupation			
Non-qualified	77,8%	69,6%	0,47***
Qualified	22,2%	30,4%	
Family income (U\$)			
Up to 217	55,6%	55,9%	0,41****
218 – 650	11,1%	26,5%	
≥ 650	33,3%	17,6%	

* p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant;

** Mann-Whitney Test; *** Fisher's Exact Test; **** Chi-squared Test;

sd=standart deviation

Table 2. Distribution of drinking and smoking habits according to oral HPV status

VARIABLE	HPV POSITIVES	HPV NEGATIVES	p-value *
Smoking			
Never	44,4%	42,3%	0,59**
Ever	55,6%	57,7%	
Lifetime smoking (years)			
Mean ± sd	17,7 ± 17,4	26,7 ± 13,3	0,27***
Number of cigarettes/day			
Mean ± sd	17,4 ± 5,8	20,6 ± 19,2	0,74***
Drinking			
Never	55,6%	46,5%	0,72**
Ever	44,4%	53,5%	
Drinking type			
Never	55,6%	47,8%	0,44****
Distilled drinks	33,3%	21,7%	
Other	11,1%	30,4%	
Lifetime drinking (years)			
Mean ± sd	24,5 ± 23,3	19,8 ± 15,3	0,63***

*p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant;

** Fisher's Exact Test ; *** Mann-Whitney Test ; **** Chi-squared Test

sd=standart deviation

Table 3. Distribution of the sexual behavior variable according to HPV status

VARIABLE	HPV POSITIVES	HPV NEGATIVES	p-value*
Age of first sexual intercourse			
Mean ± sd	17,7 ± 1,8	18,8 ± 4,2	0,54**
Oral Sex			
Ever	22,2%	25,0%	0,61***
Never	77,8%	75,0%	
Lifetime sexual partners			
Mean ± sd	4,4 ± 6,1	4,3 ± 10,5	0,68**

* p-value ≤ 0.05 was considered statistically significant;

** Mann-Whitney Test *** Fisher's Exact Test; sd=standart deviation

Figure 1 – Genotypes identified in the HPV-DNA + samples

Genotype	Samples	BamHI	DdeI	HaeIII	HinFI	PstI	RsaI
6b 449 pb	2	449	382 67	217 124 108	234 215	449	161 149 72 67
MM4 (W113B) 455pb	1	455	288 167	455	241 214	455	383 72
MM9 (PAP238A) 458pb	1	458	243 215	458	458	432 26	201 161 96

Source – Bernard et al.⁽⁹⁾

VERSÃO EM PORTUGUÊS DO ARTIGO

FREQÜÊNCIA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM LESÕES DE BOCA

Resumo

A reação em cadeia da polimerase foi utilizada para detectar o papilomavírus humano em raspado de lesões epiteliais bucais de 112 pacientes, sendo que destes 88 amostras mostraram-se viáveis através de PCR para β -globina. Para amplificação de HPV-DNA foram usados os “primers consensus” MY09/MY11 e posteriormente, os tipos específicos foram identificados por análise de polimorfismo por enzimas de restrição. O HPV genoma viral estava presente em 9 (11,3%) das amostras. Foram identificados os tipos 6b, MM4 (W13B) e MM9 (PAP238A).

Palavras-chave: papilomavírus humano, HPV, lesão oral, reação em cadeia da polimerase, PCR, epidemiologia.

Suporte Financeiro – Este trabalho contou com o apoio financeiro do FIPE – Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e FAPERGS – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul.

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Introdução

Os Papilomavírus Humano (HPV) são um grupo de vírus DNA oncogênicos que têm sido implicados na gênese de vários tumores, particularmente tumores escamosos de cérvix uterina, região anogenital, pele, trato digestivo e respiratório superior⁽¹⁾. Estes vírus são epiteliotrópicos e há mais de 120 tipos existentes, com pouco mais

de 80 deles bem caracterizados^(2, 3). Estão associados a lesões papilomatosas, hiperplásicas e verrucosas na pele e mucosas dos vários sítios onde são encontrados⁽⁴⁾. Na cavidade bucal, as lesões mais comuns são o papiloma de células escamosas, a hiperplasia epitelial focal, o condiloma acuminado, a verruga vulgar, o líquen plano, as leucoplasias e o carcinoma de células escamosas^(5, 6).

A cavidade bucal é revestida por um epitélio que possui características similares ao da região genital⁽¹⁾, e ambos os sítios estão expostos a microorganismos e a produtos estranhos dos quais vários podem ser carcinogênicos. Sabendo-se que na região genital este vírus está relacionado com o desenvolvimento de câncer de colo uterino, é possível que esta associação também esteja presente em relação ao câncer epitelial bucal. Assim, torna-se importante conhecer a freqüência deste vírus na cavidade bucal bem como sua possível relação com a presença de neoplasia maligna neste local.

A freqüência do HPV em lesões bucais é bastante variada e esta variação está relacionada à área geográfica de ocorrência, ao tipo de lesão e ao método diagnóstico utilizado. Atualmente, a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) parece ser mais sensível, rápida e menos dispendiosa, promovendo a amplificação de segmentos virais específicos e podendo facilmente ser aplicada a estudos epidemiológicos⁽⁷⁾. Este estudo tem como objetivo identificar a freqüência de HPV em lesões da cavidade bucal, em indivíduos que buscam atendimento em um serviço de referência de um hospital universitário.

Material e Métodos

Um estudo transversal foi realizado em pacientes atendidos no Serviço de Estomatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) entre março de 2000 e maio de 2001. Todos os pacientes com diagnóstico clínico de lesão epitelial de

mucosa bucal, e que concordaram em participar do estudo, foram investigados. Um total de 112 pacientes preencheram os critérios e entraram no estudo. Foram consideradas lesões do tipo epitelial as que se mostraram clinicamente como lesões exofíticas e/ou ulceradas e/ou hiperplásicas por trauma de prótese ou não, ou do tipo líquen plano ou leucoplásicas. Nas lesões com indicação de remoção total ou que necessitavam uma definição diagnóstica foram realizadas biópsias.

Preparo das Amostras e Extração do DNA: espécimes bucais foram coletados através de raspado da lesão com auxílio de escova citológica e imersos em solução salina fosfatada (PBS). Este material foi congelado a -80° C para posterior extração de DNA. Para esta extração utilizou-se o kit QIAamp DNA (QIAGEN-EUA) seguindo o protocolo indicado para fluido corpóreo. Para verificar a integridade da extração de DNA, todas as amostras foram submetidas ao método PCR para amplificação de fragmento de β -globina (286 pares de base) através dos “primers” PCO4 e GH20 e as amostras β -globina positivas foram posteriormente processadas com o objetivo de identificar o DNA do HPV.

PCR e tipagem do HPV: PCR foi o método utilizado para a amplificação e a detecção do HPV-DNA utilizando “primers consensus” da região L1 (MY09 e MY11) que amplificam um fragmento de 450 pares de base, conforme descrito por Manos e colaboradores⁽⁸⁾. As amostras foram processadas em duplicata e, a cada reação, controles sabidamente positivos para HPV e, controles negativos (sem DNA), foram utilizados evitando a produção de falso-positivos decorrentes de contaminação.

A genotipagem foi realizada através do método de análise polimórfica por restrição enzimática do produto amplificado por PCR (RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) conforme descrito por Bernard e colaboradores⁽⁹⁾, o qual inclui a identificação de 41 tipos mucosais de HPV. Neste estudo utilizou-se para a

genotipagem as enzimas *Bam*HI, *Dde*I, *Hae*III, *Hin*fI, *Pst*I e *Rsa*I propostas por este autor (quadro 1).

Análise Estatística

A frequência de DNA do HPV nas lesões bucais é descrita. As características da amostra são comparadas entre os indivíduos com lesões HPV positivas e negativas através dos testes Mann-Whitney, Qui-quadrado (ou Exato de Fisher quando indicado). Foram considerados estatisticamente significativos os achados com $p \leq 0,05$.

Resultados

A coleta de material foi realizada em 112 indivíduos. Destes, 32 (28,6%) foram excluídos (8 por não terem confirmação histológica de lesão epitelial e, 24 por serem β -globina negativos, ou seja, sem DNA ou DNA inviável para amplificação). Dos 80 indivíduos remanescentes no estudo, 58,7% tiveram suas lesões biopsiadas. Entre as lesões biopsiadas encontramos 2 lesões carcinomatosas, 4 papilomas e 41 lesões hiperplásicas com ou sem processo inflamatório associado. Entre as biopsiadas, 5 se mostraram HPV+. As demais lesões HPV+ ocorreram em líquen plano, lesão ulcerada, hiperplasia gengival e leucoplasia.

A faixa etária dos 80 indivíduos selecionados variou de 11 a 86 anos, sendo 68,7% do sexo feminino e 31,3% do sexo masculino. Eram de cor parda ou negra 18,7% indivíduos e, nenhum indígena fez parte da amostra. A maioria (70%) dos indivíduos estudados referiu até 8 anos de estudo. No que diz respeito à ocupação, 70,5% (55/78) possuíam atividade não qualificada, 55,8% (43/77) tinham um rendimento familiar mensal de até 3,99 salários mínimos (SM) e 19,4% (15/77) possuíam renda na faixa de 10 ou mais SM.

Da amostra estudada, 11,3% (9/80) mostraram-se positivos para HPV. Entre os indivíduos positivos ao HPV, a faixa etária variou de 24 a 68 anos e a idade média foi mais elevada que no grupo HPV negativo (tabela 1). Houve predominância do sexo feminino em ambos os grupos, sendo 66,7% entre os positivos e 69% entre os negativos. Os pacientes positivos ao HPV eram todos de cor branca, sendo esta também predominante, porém não exclusiva, entre os pacientes HPV negativos. Em ambos os grupos, a maioria referiu até 8 anos de escolaridade e ocupação não qualificada. A faixa de baixa renda familiar também predominou em ambos os grupos, porém os indivíduos positivos ao HPV apresentaram uma maior frequência de renda familiar igual ou superior a 10 SM. Nenhum destes achados se mostrou estatisticamente significativo (tabela 1).

Em relação ao hábito de fumar, o percentual de fumantes foi discretamente superior entre os HPV positivos. Cabe salientar que os indivíduos positivos ao HPV fumaram, em média, menos tempo e menos cigarros que os negativos. No entanto, nenhuma destas diferenças foi estatisticamente significativa. Quanto ao consumo de bebida alcoólica, embora a frequência deste consumo fosse maior entre os indivíduos HPV negativos, observou-se que o grupo HPV positivo consumia bebidas alcoólicas, há mais tempo e dentre estas bebidas, as destiladas eram as mais frequentes, porém nenhum destes achados apresentou significância estatística (tabela 2).

Também não foram observadas diferenças significativas quanto à comparação das variáveis relacionadas ao comportamento sexual entre os grupos HPV positivo e negativo (tabela 3).

Entre as amostras positivas ao DNA do HPV foram identificados os genótipos HPV6b em 2 das amostras e, HPV MM4(W13B) e HPV MM9(PAP238A) em outras 2 amostras (quadro 1).

Discussão

O objetivo deste estudo foi o de investigar a presença de HPV em lesões epiteliais bucais de pacientes que procuraram atendimento num ambulatório de referência para estomatologia, de um hospital universitário. A frequência de 11,3% de HPV positivos observada neste estudo encontra-se dentro da extensa faixa descrita na literatura (5% a 80%)⁽¹⁰⁻¹²⁾. Uma das explicações para a ampla variação desta frequência poderia ser as diferenças de sensibilidade e especificidade dos métodos utilizados para detecção do HPV em lesões orais⁽¹⁰⁻¹²⁾. De qualquer modo, mesmo estando dentro desta faixa, poderíamos dizer que a frequência observada em nosso estudo sugere uma baixa prevalência de infecção oral por HPV em nossa população. Os aspectos clínicos observados em uma lesão oral muitas vezes não permitem definir claramente o tipo de lesão. Apesar disso, as biópsias realizadas neste estudo ocorreram somente quando houve necessidade de remoção total da lesão ou para fins diagnósticos. Kellokoski e colaboradores⁽¹³⁾ relatam uma detecção em torno de 85% de DNA em amostras de biópsia através do PCR. Nossa amostra consistiu de raspado de lesão bucal através de escova citológica e posterior realização de PCR e, nossos achados não se distanciam da literatura a qual indica que 78,5% (88/112) das amostras foram positivas para beta-globina.

Entre as lesões que faziam parte de nossa amostra, encontramos 5,0% (4/80) de papiloma escamoso e 2,5% (2/80) de carcinomas epidermóides. A maioria eram lesões hiperplásicas (50%; 40/80). De acordo com a literatura⁽¹³⁾, lesões papilomatosas não são comuns e em nossos resultados a taxa de papiloma escamoso está dentro do esperado que é de 1% a 4,6%. Segundo Ward e colaboradores⁽¹⁴⁾ embora os achados levem a crer em uma causa viral para a

maioria dos papilomas escamosos, não é possível confirmar este papel etiológico para o HPV. Cabe salientar que das 4 lesões de papiloma observadas neste estudo e, confirmadas por exame histopatológico, somente uma mostrou-se positiva para HPV. O genótipo desta lesão foi o HPV 6b⁽⁹⁾, e está de acordo com a literatura que mostra serem os tipos 6, 11 e 16 os mais freqüentemente encontrados^(13, 15).

Sabe-se que a hiperplasia epitelial focal é bastante freqüente entre indígenas e que está associada ao HPV tipos 13 e 32⁽¹⁶⁾. No entanto, apesar de em várias regiões do Brasil, incluindo a região sul onde foi realizado este estudo, existirem comunidades indígenas, não se observaram indígenas na amostra estudada.

É reconhecido que o papilomavírus tem um papel importante em uma série de lesões, particularmente várias verrugas, o que tem relevado o seu significado na etiologia de lesões pré-malignas e neoplasmas epiteliais malignos, incluindo aqueles que envolvem a mucosa bucal^(15, 17). No entanto, nenhuma lesão de verruga vulgar ou condiloma acuminado foi detectada na amostra estudada. Sabe-se que a transmissão destas duas lesões está associada a auto-inoculação ou à prática de sexo oral. Nesta amostra, o relato de prática de sexo oral foi baixo, o que poderia justificar a ausência destas lesões em nossos achados, embora, na maioria das vezes, este relato possa não traduzir a realidade, conforme descrito por Casnati e colaboradores⁽⁴⁾.

Os genótipos identificados nas amostras positivas ao HPV foram 6b, MM4 e MM9. O tipo HPV6b tem sido descrito por vários autores^(10, 14, 18, 19) e parece ser um tipo comumente observado em lesões orais. Por outro lado, os tipos MM4 e MM9, considerados tipos de alto risco^(20, 21), são raramente descritos como presentes em lesões da cavidade oral⁽²²⁾. Apesar de não ter sido possível tipar todas as amostras positivas acreditamos que estes achados são muito relevantes.

Neste estudo o paciente que apresentou o genótipo MM9 (atualmente designado HPV 73)⁽²⁰⁾ era um transplantado renal, em uso de imunossupressor e corticóide. O HPV parece estar relacionado, de alguma forma, ao estado de imunossupressão do hospedeiro. Há um crescente aumento no número de diagnósticos de infecção pelo HPV, em indivíduos com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, transplantados renais, gravidez ou mesmo doenças que requeiram corticoterapia prolongada. Observa-se que nestes pacientes o comportamento evolutivo das lesões é mais agressivo⁽²³⁾. Pacientes que recebem terapia imunossupressora após transplantes de órgãos têm risco aumentado para o desenvolvimento de tumores malignos. A incidência de neoplasia nestes pacientes é 100 vezes maior que em pacientes não transplantados, controlando para o efeito da idade. A causa para este aumento na incidência não é clara, mas pode ser devida a combinação de diminuição da detecção de células cancerígenas pelo sistema imune, estimulação antigênica crônica pelo órgão transplantado, efeitos carcinogênicos diretos de drogas imunossupressoras ou proliferação de vírus oncogênicos⁽²⁴⁾.

Não há associação preferencial demonstrada entre HPV tipo específico e uma lesão oral em particular. Indivíduos que são imunocomprometidos desenvolvem lesões com aparência clínica não-usual e, estas lesões incluem tipos de HPV não comumente vistos em lesões bucais. O fato de que a imunossupressão é um fator predisponente para lesões associadas ao HPV, sugere que a regulação da imunidade tem um papel na patogênese destas lesões⁽²⁵⁾. Outro genótipo, não comum, observado na cavidade bucal foi o HPV MM4, também de alto risco, encontrado em uma lesão de líquen plano. Evidência recente indica que o líquen plano trata-se de um distúrbio mucocutâneo imunologicamente mediado⁽²⁶⁾.

Os outros dois genótipos identificados tratam-se do tipo HPV 6b encontrado em um paciente portador de papiloma escamoso sublingual, e, em outro paciente com leucoplasia em rebordo anterior da mandíbula, que relatou ressecção de tumor maligno em assoalho de boca há 10 anos. Em lesões leucoplásicas e de assoalho de boca, Chang e colaboradores⁽¹⁷⁾ relatam que o genótipo mais freqüente é o HPV16 porém, genótipo HPV 6, normalmente associado a lesões benignas foi encontrado por sua equipe em carcinoma de células escamosas. Este último caso faz-nos pensar em latência viral e possibilidade de ser a cavidade oral um reservatório para este vírus⁽²⁷⁾

Nossos resultados reforçam o conceito de infecção por tipos incomuns de HPV em pacientes imunocomprometidos e a possibilidade de latência viral ou, de a cavidade bucal ser reservatório para este vírus proporcionando que se manifeste diante de alteração na imunidade.

Bibliografia

1. Lakshmi S, Asha Nair S, Radhakrishna Pillai M. Oral cancer and human papillomaviruses: is there a link?. *Journal of Surgical Oncology* 1993;52:193-96.
2. Porro AM. Detecção e tipagem do papilomavírus humano em lesões cutâneas de verruga viral de pacientes infectados pelo HIV-1. [Doutorado]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2000. 110 p.
3. De Villiers EM, Lavergne D, McLaren K, Benton EC. Prevailing papillomavirus types in non-melanoma carcinomas of the skin in renal allograft recipients. *Int J Cancer* 1997;73:356-61.
4. Casnati BE, Guerrero A, Hornos C, Guerra MJ. Valoración clínica de las lesiones bucales y genitales en pacientes portadores de Papiloma Virus Humano (HPV). *Odontologia Uruguia* 1999;47(1):3-8.
5. Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K. Human papillomavirus (HPV) infections and their associations oral disease. *J Oral Pathol Med* 1991;20:305-17.
6. Mao E-J. Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and malignant epithelia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:320-9.
7. Jimenez C, Correnti M, Salma N, Cavazza ME, Perrone M. Detection of human papillomavirus DNA in benign oral squamous epithelial lesions in Venezuela. *J Oral Pathol Med* 2001;30:385-8.
8. Manos MM, Ting Y, Wright DK, Lewis AJ, Broker TR, Wolinsky S, M. The use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomaviruses. *Cancer Cells* 1989;7:209-14.

9. Bernard HU, Chan SY, Manos MM, et al. Identification and assessment of known and novel human papillomaviruses by polymerase chain reaction amplification, restriction fragment length polymorphisms, nucleotide sequence, and phylogenetic algorithms. *J Infect Dis* 1994;170:1077-85.
10. Völter C, He Y, Delius H, et al. Novel HPV types present in oral papillomatous lesions from patients with HIV infection. *Int J Cancer* 1996;66(4):453-6.
11. Kashima HK, Kutcher M, Kessis T, Levin LS, de Villiers EM, Shah K. Human papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus, and clinically normal epithelium of the oral cavity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1990;99:55-61.
12. Maitland NJ, Cox MF, Lynas C, Prime SS, Meanwell CA, Scully C. Detection of human papillomavirus DNA in biopsies of human oral tissue. *Br J Cancer* 1987;56:245-50.
13. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Chang F, Yliskoski M, Syrjänen KJ. Southern blot hybridization and PCR in detection of oral human papillomavirus (HPV) infections in women with genital HPV infections. *J Oral Pathol Med* 1992;21(10):459-64.
14. Ward KA, Napier SS, Winter PC, Maw RD, Dinsmore WW. Detection of human papilloma virus DNA sequences in oral squamous cell papillomas by the polymerase chain reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;80:63-6.
15. Scully C, Prime S, Maitland N. Papillomaviruses: their possible role in oral disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60:166-174.
16. Beaudenon S, Praetorius F, Kremsdorf D, et al. A new type of human papillomavirus associated with oral focal epithelial hyperplasia. *J Invest Dermatol* 1987;88(2):130-5.

17. Chang F, Syrjänen S, Nuutinen J, Kärjä J, Syrjänen K. Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in oral squamous cell carcinomas by in situ hybridization and polymerase chain reaction. *Arch Dermatol Res* 1990;282(8):493-7.
18. Costa LJ, Silveira FRX, Batista JM, Birman EG. Human Papiloma Virus - Its association with Epithelial Proliferative Lesions. *Braz Dent J* 1994;5(1):5-10.
19. Jontell M, Watts S, Wallström M, Levin L, Sloberg K. Human papilloma virus in erosive oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990;19(6):273-7.
20. Meyer T, Arndt R, Christophers E, et al. Association of rare human papillomavirus types with genital premalignant and malignant lesions. *The Journal of Infectious Diseases* 1998;178:252-5.
21. Manos MM, Waldman J, Zhang TY, et al. Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomaviruses. *The Journal of Infectious Diseases* 1994;170:1096-99.
22. Ball E. Virus papiloma humano. *Biologia molecular, genética y mecanismo oncogênico. Derm Venez* 1998;37:136-41.
23. Giraldo PC, Simões JA, Ribeiro Filho AD, Tambascia JK, Dias ALV, Pacello PCC. Avaliação citológica da orofaringe de mulheres portadoras do HPV genital. *Rev Bras Ginecol Obstet* 1996;18(9):737-42.
24. Demetrick DJ, Inoue M, Lester WM, Kingma I, Duggan MA, Paul LC. Human papillomavirus type 16 associated with oral squamous carcinoma in a cardiac transplant recipient. *Cancer* 1990;66(8):1726-31.
25. Garlick JA, Taichman LB. Human papillomavirus infection of the oral mucosa. *Am J Dermatopathol* 1991;13(4):386-95.
26. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1998.

27. Kellokoski JK, Syrjänen SM, Syrjänen KJ, Yliskoski M. Oral mucosal changes in women with genital HPV infection. *J Oral Pathol Med* 1990;19:142-8.

Tabela 1. Distribuição das características demográficas de acordo com a presença ou ausência de HPV-DNA na amostra estudada

VARIÁVEL	HPV POSITIVOS	HPV NEGATIVOS	valor de p *
Idade (anos) média ± dp	53,1 ± 15,2	47,8 ± 16,3	0,27**
Cor de pele			
Branco	100,0%	78,9%	0,19***
Não-branco	0,0%	21,1%	
Escolaridade (anos)			
≤ 8	66,7%	70,4%	0,54***
> 8	33,3%	29,6%	
Ocupação			
Não-qualificada	77,8%	69,6%	0,47***
Qualificada	22,2%	30,4%	
Renda Familiar (SM)			
Até 3,99	55,6%	55,9%	0,41****
4 a 9,99	11,1%	26,5%	
≥ 10	33,3%	17,6%	

* valor de p ≤ 0.05 foi considerado estatisticamente significativo;
 ** Teste Mann-Whitney; *** Teste Exato de Fisher; ****Teste Qui-quadrado ;
 SM= salário mínimo (valor considerado - R\$130,00); dp=desvio padrão

Tabela 2. Distribuição de usuários de álcool e fumo de acordo com a presença ou ausência de HPV-DNA na amostra estudada

VARIÁVEL	HPV		Valor de p *
	POSITIVOS	NEGATIVOS	
Fumo			
Não	44,4%	42,3%	0,59**
Sim	55,6%	57,7%	
Tempo de fumo			
Média ± dp	17,7 ± 17,4	26,7 ± 13,3	0,27***
Número de cigarros/dia			
Média ± dp	17,4 ± 5,8	20,6 ± 19,2	0,74***
Bebida			
Não	55,6%	46,5%	0,72**
Sim	44,4%	53,5%	
Tipo de bebida			
Nunca bebeu	55,6%	47,8%	0,44****
Destilados	33,3%	21,7%	
Outros	11,1%	30,4%	
Tempo de bebida (anos)			
Média ± dp	24,5 ± 23,3	19,8 ± 15,3	0,63***

*valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo;

** Teste Exato de Fisher ; *** Teste Mann-Whitney; ****Teste Qui-quadrado

dp=desvio padrão

Tabela 3. Distribuição de variáveis de comportamento sexual de acordo com a presença ou ausência de HPV-DNA na amostra estudada

VARIÁVEL	HPV POSITIVOS	HPV NEGATIVOS	valor de p*
Idade da primeira relação sexual			
Média ± dp	17,7 ± 1,8	18,8 ± 4,2	0,54**
Sexo oral			
Sim	22,2%	25,0%	0,61***
Não	77,8%	75,0%	
Número de parceiros na vida			
Média ± dp	4,4 ± 6,1	4,3 ± 10,5	0,68**

* valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo;

** Teste Mann-Whitney ***Teste Exato de Fisher; dp=desvio padrão

Quadro 1 – Genótipos identificados nas amostras HPV-DNA +

Genótipo	Amostras	BamHI	Ddel	HaeIII	HinFI	PstI	RsaI
6b 449 pb	2	449	382 67	217 124 108	234 215	449	161 149 72 67
MM4 (W113B) 455pb	1	455	288 167	455	241 214	455	383 72
MM9 (PAP238A) 458pb	1	458	243 215	458	458	432 26	201 161 96

Fonte: Bernard e colaboradores⁽⁹⁾

ANEXOS

ANEXO 1

TECIDO EPITELIAL

A superfície externa do corpo e quase todas as superfícies internas são recobertas por folhetos celulares contínuos conhecidos como membranas epiteliais ou epitélios que, juntamente com várias glândulas que se desenvolvem a partir deles, constituem o tecido epitelial. Este é um tecido básico que pode desenvolver-se a partir de qualquer das diferentes camadas germinativas do embrião. O componente epitelial da pele, por exemplo, origina-se do ectoderma; o revestimento epitelial e as glândulas do trato digestivo são derivados do endoderma; e os revestimentos serosos das cavidades peritoneal, pleural e pericárdica, juntamente com o revestimento do sistema circulatório, são produtos do mesoderma. Por convenção, o revestimento membranoso das cavidades corporais é denominado mesotélio, enquanto que aquele do coração, vasos sanguíneos e linfáticos é conhecido como endotélio. Entretanto, todos estes revestimentos são folhetos contínuos compostos de células contíguas e, portanto, representam membranas epiteliais típicas, apesar de seus nomes especiais.

Características

É caracterizado por íntimo contato intercelular de suas células.

Os epitélios são classificados com base em seu número de camadas celulares e, as principais características de suas células mais superficiais. Alguns epitélios possuem apenas uma camada celular de espessura porém, todos são compostos apenas de células fortemente aderidas. E, não contém capilares; isto é, são avasculares. Portanto, dependem do tecido conjuntivo adjacente para receber nutrientes e oxigênio e para a eliminação de escórias. As células epiteliais estão

fortemente fixadas ao tecido conjuntivo por um componente denominado membrana basal. Os epitélios estão funcionalmente adaptados para vários fins, mas são todos basicamente não especializados ou adaptados para absorção, secreção ou proteção.

Um epitélio simples consiste em uma única camada de células. Um epitélio estratificado possui espessura de pelo menos 2 camadas celulares e um epitélio pseudoestratificado possui apenas uma camada celular de espessura mas, dá a impressão de ser estratificado porque algumas de suas células são mais curtas que outras e, portanto, não alcançam sua superfície livre.

Temos 8 subtipos de epitélio:

1. Epitélio Escamoso* Simples (* também Pavimentoso por ser semelhante a tacos ou ladrilhos de um pavimento);
2. Epitélio Cúbico Simples
3. Epitélio Cilíndrico Simples(ciliado ou não; com células caliciformes ou não);
4. Epitélio Cilíndrico Ciliado Pseudoestratificado (ciliado ou não; com células caliciformes ou não);
5. Epitélio Cilíndrico Estratificado;
6. Epitélio de Transição;
7. Epitélio Pavimentoso Estratificado Não-Queratinizado – as células basais são cilíndricas e deixam de ser poliédricas para tornarem-se pavimentosas à medida que se aproximam da superfície livre. Este epitélio não produz queratina nem é secretor. Porém, reveste superfícies úmidas que estão sujeitas a desgaste, tornando necessário que a membrana seja mantida úmida por líquidos ou secreções provenientes de outros locais. O interior da boca é um dos locais revestidos por este epitélio. Enquanto as células dos epitélios pavimentoso

simples, cúbico simples e cilíndrico simples são capazes de mitose, as células principais dos demais epitélios são renovadas a partir de células-tronco.

ANEXO 2

INSTRUMENTO DE PESQUISA

DADOS DO PACIENTE

Data do exame:..... Número do questionário:.....

Nome:..... Idade:.....

Sexo: () M () F Cor: () branco () mulato () negro ()
outro _____

Procedência:..... Profissão:.....

Escolaridade: () 1º incompleto () 1º completo () 2º incompleto () 2º completo
() superior _____ anos de estudo () analfabeto

Residência: saneamento: () água encanada tratada () poço artesiano () bica
() rede de esgoto () esgoto aberto
rede elétrica: () sim () não

Renda familiar aproximada: _____

Tabagismo: Fuma? () sim () não Há quanto tempo? _____
Tipo: _____ Quantos cigarros/dia? _____
Se parou, há quanto tempo? _____

Alcoolismo: Faz uso de bebidas alcoólicas? () sim () não
Tipo: () destilados () fermentados
Quantidade: _____/dia _____/semana () eventualmente
Há quanto tempo? _____ Se parou, há quanto tempo? _____

Prática Sexual: Você já teve ou tem relações sexuais? () sim () não
Com que idade teve a 1ª relação sexual? _____
Quantos parceiros sexuais teve até agora? _____
Pratica ou praticou sexo oral? () sim () não () no passado

Doença Sistêmica: () sim () não Qual? _____

Uso de medicamentos: () sim () não Qual? _____

DADOS DO EXAME

Diagnóstico ou suspeita clínica:

Resultado da biópsia ou esfregaço:

Diagnóstico pelo método PCR:

ANEXO 3

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Projeto de Pesquisa: Prevalência de Papilomavírus Humano em lesões da boca.

Estamos lhe convidando a participar de um estudo que verificará qual a frequência de lesões na boca causadas por um vírus chamado papiloma. Além disso, pretendemos estudar quais os fatores que podem contribuir para que esse tipo de lesão apareça.

A participação no estudo consiste em responder um questionário e permitir a coleta de material da boca, que será feito através de uma escova com uma pequena raspagem do local da boca que apresentar alteração.

Esse procedimento poderá eventualmente causar um pequeno sangramento, o qual regride espontaneamente.

Todas as informações obtidas serão de caráter confidencial para fins de pesquisa. Participando ou não do estudo, você estará recebendo um tratamento comprovadamente bom para você e, caso queira retirar-se do estudo, estará livre para fazê-lo a qualquer momento que desejar. Se você tiver alguma pergunta a fazer antes de decidir, sinta-se à vontade para fazê-lo.

Eu,.....
.....fui informado(a) dos objetivos especificados acima e, da justificativa desta pesquisa, de forma clara e detalhada. Recebi informações específicas sobre cada procedimento no qual estarei envolvida, dos desconfortos ou riscos previstos, bem como dos benefícios.

Concordo que as informações que eu prestar façam parte do estudo, e que ficarei com uma via desta declaração.

participante

pesquisador
Carmen Maria Lazzari
Fone (51) 217 44 99

Data: _____

ANEXO 4

* Primers para amplificação de Beta-globina:

GH20 - GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC

PCO4 - CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

* Primers para amplificação de HPV – região L1:

MY09 – CGT CCM ARR GGA WAC TGA TC

MY11 – GCN CAG GGW CAT AAY AAT GG

Onde M (A ou C); R(A ou G); W(A ou T); Y(C ou T).

*MIX para PCR β -globina e HPV

Para cada amostra:

DNA	10,0 μ l
Primers - 20pmol	1,0 μ l PCO4 + 1,0 μ l GH20
MgCl ₂ - 50 mM	2,5 μ l
Taq - 500 U/ml	0,3 μ l (=1,5U)
T10x (tampão)	5,0 μ l
DNTP - 10 mM	1,0 μ l
H ₂ O destilada	29,2 μ l
<hr/>	
	50,0 μ l (40 μ l Mix + 10 μ l DNA)

*PCR para amplificação de segmento β -globina:

1. 94° C – 4 minutos
2. 94° C – 1 minuto (separação das fitas de DNA)
3. 60° C - 2 minutos (anelamento das bases nitrogenadas (A C G T) com DNA segundo modelo fornecido através do primer)
4. 72° C – 3 minutos (extensão- ocorre a remoção dos resíduos, limpeza das fitas).
5. Repetir passos 2, 3 e 4 por 35 vezes;
6. 72° C – 10 minutos.

*PCR para amplificação do segmento MY09/MY11 do HPV-DNA:

1. 94° C - 4 minutos
2. 94° C – 1 minuto
3. 55° C – 1 minuto
4. 72° C – 2 minutos
5. repetir os passos 2, 3 e 4 por 35 vezes
6. 72° C – 5 minutos.

ANEXO 5

PROTOCOLO PARA EXTRACÇÃO DE DNA COM KIT QIAamp – para LIQUIDO CORPORAL

*Descongelar as amostras em temperatura ambiente e centrifugar , por 10 min (minutos), a 2000 rpm (rotações por minuto), para a formação do pelet.

*Ao abrir o kit de DNA – QIAamp foi acrescentado álcool absoluto no buffer AW1 e AW2, conforme solicitação do fabricante.

1. Colocar 200 μ l da amostra (pelet) em um tubo ependorf (se volume menor, completar com PBS); identificar os tubos;
2. Acrescentar 20 μ l de proteinase K;
3. Acrescentar 200 μ l de Buffer AL. Aplicar vortex por 15 seg (segundos);
4. Incubar a 56° C por 10 min;
5. Adicionar 200 μ l de etanol (96-100 %) e dar um vortex de 15 seg. Ocorrerá a precipitação do DNA;
6. Transferir o conteúdo todo para os tubos de coluna. Fechar o tubo e centrifugar com 8000 rpm por 1 min. Descartar o tubo que contém o filtrado e colocar a coluna em um novo tubo;
7. Adicionar cuidadosamente 500 μ l de Buffer AW1 e centrifugar com 8000 rpm por 1 min. Trocar novamente tubos coletores;
8. Adicionar 500 μ l de Buffer AW2. Centrifugar a 14000 rpm por 3 min;
9. Identificar ependorfs para receber material da coluna. Adicionar 200 μ l de Buffer AE previamente aquecido por 10 min a 50° C na quantidade exata para cobrir as amostras trabalhadas. Este Buffer remove o DNA da coluna.

10. Aquecer a coluna com o ependorf por 10 min a 50° C. Centrifugar a 8000 rpm por 1 min. Desprezar coluna e guardar o ependorf com a solução no freezer para posterior realização do PCR.