

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

**ASSOCIAÇÃO ENTRE O PAPILOMA VÍRUS HUMANO E O CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE OROFARINGE: UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE**

CARLA CUENCA SCHWARTSMANN

ORIENTADOR: PROF. DR. GILBERTO SCHWARTSMANN

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina:
Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Mestre**

Porto Alegre

2013

DEDICATÓRIA

À minha família, em especial aos meus pais
Silvana e Carlos, minhas irmãs Marcela e Gabriela
e ao meu grande amor, companheiro e amigo de todas as horas, Felipe.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Dr. Gilberto Schwartzmann, meu orientador, mas antes de tudo meu tio. Agradeço a oportunidade de trabalhar com esse ser humano fantástico, cheio de energia e apaixonado por tudo que faz.

Agradeço também ao Dr. Gerson Maahs, idealizador desse projeto. Um exemplo de caráter e competência e um dos grandes responsáveis pela minha trajetória otorrinolaringológica.

Ao Dr. Pedro Aleixo pela colaboração inestimável para a conclusão desse trabalho. Obrigada pelas análises laboratoriais, pela paciência e pela oportunidade de aprendizado.

A realização desse projeto não seria possível sem a colaboração da Dra. Lúcia Kliemann. Obrigada pela ajuda na metodologia e análises laboratoriais do trabalho.

Agradeço também aos alunos Daiane e Gustavo, assim como à Flavinha do laboratório de Patologia Experimental do HCPA. Obrigada à funcionária da biblioteca da PUC Carol – agradeço de coração - e à bibliotecária Isabel.

Meu profundo agradecimento aos meus colegas e aos residentes de otorrino da PUC pela compreensão ao me ausentar durante a finalização desse projeto.

Em último lugar, mas com certeza o mais importante, agradeço à minha família. Obrigada aos meus pais pela formação de quem eu sou hoje, pelas oportunidades que tive e por todo o amor que vocês me deram. Obrigada às minhas irmãs pela nossa amizade e carinho. Obrigada a todos da minha grande família (Cuenca, Schwartzmann, Sieczkowski, Caleffi, Starosta e Moreira), afinal, família é tudo! Em especial agradeço ao meu tio Renato pelos conselhos e reflexões e às minhas avós, Nair e Maria. Vó Nair, eu sei que do lugar onde você estiver deve ter orado muito por mim.

Tenho certeza que a conclusão do meu mestrado não seria possível sem a ajuda do meu marido – Gordo, em quem eu muito me espelho e admiro. Obrigada pela compreensão nas horas de ausência ou nos momentos de angústia. Obrigada pelas palavras de carinho e conforto quando eu mais precisei.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a conclusão de mais uma etapa da minha vida acadêmica.

"Não deixe que a saudade sufoque que a rotina acomode que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu". Érico Veríssimo

RESUMO

Introdução: A incidência do carcinoma epidermóide de orofaringe (CEO) aumentou em todo o mundo nos últimos 30 anos. Estudos identificaram o papiloma vírus humano (HPV) como um fator de risco para essa neoplasia. **Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi verificar a frequência do HPV em pacientes com CEO e em pacientes sem neoplasia maligna e avaliar a existência de uma diferença estatisticamente significativa na frequência do HPV entre os dois grupos. O objetivo secundário foi estudar a correlação entre a infecção pelo HPV e a localização do tumor na orofaringe, o estadiamento clínico e o grau de diferenciação tumoral. **Métodos:** Foi realizado um estudo de caso-controle com 59 pacientes com CEO e 54 pacientes sem neoplasia, no qual foram analisados os blocos de parafina contendo material tumoral e tecido não neoplásico. Foram analisadas respectivamente a frequência do HPV e sua atividade viral utilizando a técnica de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) para HPV de baixo risco (BR) e alto risco (AR) e a expressão imunoistoquímica da proteína P16. **Resultados:** A frequência do HPV foi maior no grupo caso em comparação ao grupo controle quando utilizamos a expressão imunoistoquímica da proteína P16 como método de detecção isolado (OR=10,3; P<0,001) e quando utilizamos a CISH e a expressão imunoistoquímica da proteína P16 em conjunto (OR=21,4; P<0,001). A CISH isoladamente não mostrou uma diferença estatisticamente significativa na frequência do HPV entre os grupos estudados (P=0,572). A localização tumoral na orofaringe e o estadiamento clínico não mostraram correlação com a infecção pelo HPV em nenhum dos métodos utilizados, assim como o grau de diferenciação tumoral (P>0,20). **Conclusão:** Utilizando-se a técnica de imunoistoquímica para P16 isolada ou combinada com a técnica de CISH, observou-se uma maior positividade para o HPV no grupo de pacientes com CEO. A localização do tumor na orofaringe, o estadiamento clínico e o grau de diferenciação tumoral não tiveram correlação com a positividade para o HPV.

Palavras chave: carcinoma de células escamosas; hibridização *in situ*; imunoistoquímica; orofaringe; papillomavirus humano 16; tonsila palatina

ABSTRACT

Introduction: The incidence of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) has increased worldwide over the last 30 years. Studies have identified human papillomavirus (HPV) infection as a risk factor for OSCC. **Objectives:** To compare the frequency of HPV infection in patients with OSCC and patients with benign oral or oropharyngeal disease and ascertain whether a statistically significant difference in HPV frequency exists between these two groups. As a secondary objective, to assess potential correlations between HPV positivity, anatomic site of OSCC, tumor staging, and degree of tumor differentiation. **Methods:** Case-control study. The sample comprised 59 patients with OSCC and 54 non-OSCC controls who underwent surgery for benign oral or oropharyngeal conditions. Paraffin-embedded specimens from cases and controls were tested for HPV positivity by chromogenic *in situ* hybridization (CISH) for low-risk (LR) and high-risk (HR) HPV, and HPV activity was assessed by P16 immunohistochemistry (IHC). **Results:** The frequency of HPV positivity was higher in the case group than in the control group when assessed by P16 IHC alone (OR=10.3, $P<0.001$) or by CISH and P16 IHC in combination (OR=21.4, $P<0.001$). CISH alone did not detect any significant between-group difference in HPV frequency ($P=0.572$). Tumor site, staging, and differentiation did not correlate with HPV positivity with any of the methods employed ($P>0.20$). **Conclusion:** Using a P16 IHC assay alone or combined with CISH, the authors showed a higher rate of HPV positivity among patients with OSCC, as compared with patients with benign disease. Tumor site within the oropharynx, tumor stage, and degree of differentiation did not correlate with HPV positivity.

Key words: squamous cell carcinoma; *in situ* hybridization; immunohistochemistry; oropharynx; human papillomavirus 16; palatine tonsil.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa de câncer nos Estados Unidos, 2013. Adaptado da referência 1.	15
Tabela 2. HPV em pacientes sem neoplasia maligna	20
Tabela 3. HPV em pacientes com carcinoma epidermóide	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Atividade do HPV de alto risco. Adaptado de: <http://genetics.thetech.org> .22

Figura 2. **A:** Regulação fisiológica do controle celular. **B:** Transformação oncogênica mediada pelo HPV de alto risco. Adaptado de: <http://www.mtmlabs.com>.....23

LISTA DE ABREVIATURAS

- AR: alto risco
- BR: baixo risco
- *CDKN2A*: *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (inibidor de quinase ciclina dependente 2A)
- CE: carcinoma epidermóide
- CEO: carcinoma epidermóide de orofaringe
- CID: Classificação Internacional de Doenças
- CISH: *Chromogenic In Situ Hybridization* (hibridização *in situ* cromogênica)
- DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (ácido desoxirribonucléico)
- E2F: *transcription factor E2F* (fator de transcrição E2F)
- E6: *Early protein 6* (proteína precoce 6)
- E7: *Early protein 7* (proteína precoce 7)
- *et al.*: do latim *et alii* (e outros)
- EUA: Estados Unidos da América
- HIS: *In Situ Hybridization* (hibridização *in situ*)
- HPV: *Human Papillomavirus* (papiloma vírus humano)
- INCA: Instituto Nacional do Câncer
- OMS: Organização Mundial de Saúde
- P16: *Protein P16^{INK4a}* (proteína P16^{INK4a})
- P53: *Protein 53* (proteína 53)
- PCR: *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)
- RB: *Retinoblastoma* (retinoblastoma)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Estratégia de busca	14
2.2 Revisão.....	15
3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo principal.....	28
3.2 Objetivos secundários.....	28
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29
5. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	36
6. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS	57
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
8. ANEXOS	81
Anexo A – Protocolo de investigação	81
Anexo B – Parecer da Comissão Científica do HCPA	82

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide de orofaringe (CEO) representa 3 a 5% de todos os cânceres no mundo ocidental^{1,2}. Em 2008, as mortes relacionadas ao câncer da cavidade oral e faringe na população mundial foram estimadas em 223.204 casos, entre os quais se situa o CEO³. Tradicionalmente, o CEO é caracterizado por um prognóstico reservado e com uma taxa de sobrevida em 5 anos de aproximadamente 60%⁴. Ao contrário de outras neoplasias malignas de cabeça e pescoço, a incidência do CEO vem aumentando nas últimas três décadas, especialmente entre os homens jovens⁵⁻¹³.

A associação entre o Papiloma Vírus Humano (HPV) e o carcinoma epidermóide (CE) em várias topografias do corpo humano, incluindo a orofaringe, foi inicialmente descrita por Syrjänen *et al.*¹⁴ em 1983. Em 1995, tendo como base evidências epidemiológicas e moleculares, a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer reconheceu os subtipos de HPV 16 e 18 como carcinogênicos em humanos¹⁵.

Estudos recentes têm demonstrado que o HPV é um fator de risco para o CEO, independente dos demais fatores já conhecidos, como o tabagismo e o etilismo^{6,7,16}. Entretanto, a sua ação isolada não parece ser uma condição suficiente para o desenvolvimento do câncer⁵. Além disto, o CEO pode ocorrer na ausência do HPV e a presença de infecção pelo HPV pode não resultar em transformação maligna⁵. O CEO HPV positivo parece se comportar como uma entidade clínica distinta, acometendo pacientes mais jovens e apresentando um melhor prognóstico quando comparado aos casos de CEO HPV negativos^{6,7,17}.

A epidemiologia da infecção pelo HPV na mucosa da orofaringe ainda não é bem compreendida, mas alguns estudos sugerem que a frequência da infecção aumenta com a idade^{5,17-26}. Há dados conflitantes com relação à prevalência do HPV no CEO, sobretudo devido às características da população estudada, às diferenças metodológicas na identificação da presença do HPV e seus subtipos e bem como pelo tipo de material utilizado (fresco ou arquivado em bloco de parafina)^{18,27-36}.

Embora existam vários métodos para a detecção do HPV em tecidos oriundos da região de cabeça e pescoço, a melhor técnica ainda não está claramente estabelecida^{17,19,30,32,37-39}. A reação em cadeia da polimerase (PCR) realizada em amostra de tecido fresco é considerada por alguns autores como o teste padrão ouro para o diagnóstico da presença do HPV e é o teste em uso há mais tempo¹⁷. Entretanto, outras técnicas vêm sendo incorporadas, como a hibridização *in situ* (HIS) e a imunistoquímica^{17,37}. Os critérios mais importantes na escolha do método a ser empregado na detecção do HPV são a sua especificidade, sensibilidade, reprodutibilidade, custos e viabilidade^{17,35}.

Estas informações têm adquirido importância crescente, uma vez que podem auxiliar na identificação de subgrupos de pacientes com prognóstico e probabilidade de resposta ao tratamento distintos^{29,40,41}. Recentemente, estudos clínicos identificaram fortes evidências de que o status tumoral do HPV é um fator prognóstico independente para a sobrevida global e para a sobrevida livre de doença em pacientes com CEO^{29,40,41}.

Embora haja um número crescente de estudos sobre a história natural da infecção oral e orofaríngea pelo HPV e a sua relação com a carcinogênese, o tema é ainda rico em controvérsia^{5,17,19,42}. A obtenção de um maior número de informações científicas sobre o tema pode ter grande importância em programas de prevenção e detecção precoce do CEO no futuro¹⁹. Neste sentido, o presente estudo visa avaliar a prevalência da infecção pelo HPV em pacientes portadores de CEO, comparativamente a indivíduos sem neoplasia, tendo como base uma amostra de pacientes de um hospital universitário no sul do Brasil.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estratégia de busca

A revisão de literatura foi realizada pela busca de artigos no *PubMed* (base de dados bibliográficos da Biblioteca Nacional de Medicina e Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos). Ao procurar no *Mesh (Medical Subject Headings)*, que é a enciclopédia de vocabulários sinônimos utilizada para a indexação de artigos no *PubMed*, pelos termos abaixo representados, foram identificados os números de referências abaixo mencionados:

- “oropharyngeal neoplasms”: 5.356
- “human papillomavirus 6”: 355
- “human papillomavirus 11”: 234
- “human papillomavirus 16”: 2.163
- “human papillomavirus 18”: 909
- “oropharynx”: 10.921
- “neoplasms”: 2.412.661
- “immunohistochemistry”: 484.145
- “in situ hybridization”: 78.064
- “palatine tonsil”: 7.911

Ao cruzarmos os termos anteriores, encontramos os seguintes números de referências:

- “oropharyngeal neoplasms” e “human papillomavirus 16”: 121
- “oropharyngeal neoplasms” e “human papillomavirus 18”: 19
- “oropharynx” e “human papillomavirus 6”: 2
- “oropharynx” e “human papillomavirus 11”: 1
- “oropharynx” e “human papillomavirus 16”: 9
- “oropharynx” e “human papillomavirus 18”: 2
- “oropharyngeal neoplasms” e “immunohistochemistry”: 295
- “oropharyngeal neoplasms” e “in situ hybridization”: 78
- “neoplasms” e “palatine tonsil”: 1.088

Consultamos também o *Embase*, outra ferramenta de pesquisa biomédica. Ao procurarmos pelo termo “oropharyngeal neoplasms” encontramos 4.773 referências. Colocando “human papillomavirus” encontramos 46.243 referências e “oropharynx” 23.806.

2.2 Revisão

O câncer foi uma das principais causas de morte no mundo em 2008, contabilizando 7,6 milhões de óbitos⁴³. Estima-se que, para o ano de 2030, haverá cerca de 27 milhões de casos novos e 17 milhões de mortes por câncer, com uma prevalência estimada de 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com o diagnóstico de câncer^{43,44}.

Segundo o projeto *Globocan* da Organização Mundial de Saúde (OMS), no ano de 2008 ocorreram 321.000 novos casos de câncer no Brasil e 190.000 óbitos relacionados ao câncer³. No Brasil são esperados aproximadamente 518.000 novos casos de câncer para o ano de 2013⁴⁴.

A Sociedade Americana de Câncer estimou os casos novos de câncer de cavidade oral e faringe e os casos de morte devido a essa neoplasia para o ano de 2013¹. Os dados encontram-se na tabela 1.

Tabela 1. Estimativa de câncer nos Estados Unidos, 2013. Adaptado da referência 1.

	Casos novos estimados			Mortes estimadas		
	M e F	M	F	M e F	M	F
Cavidade oral e faringe	41.380	29.620	11.760	7.890	5.500	2.390

M = masculino; F = feminino

No Brasil, dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA)⁴⁴ estimam uma ocorrência de mais de 14.000 novos casos de câncer da cavidade oral para o ano de 2012, sendo 14% deles na região sul. O Rio Grande do Sul possui uma taxa estimada de 11,78 casos para cada 100 mil homens e de 3,31 casos para cada 100 mil mulheres. Segundo a pesquisa realizada pelo INCA, foram considerados como

neoplasias malignas da cavidade oral os tumores classificados segundo a Classificação Internacional de Doenças (CID) como CID C00 a C10. Entre esta classificação situam-se os tumores de orofaringe, os quais são constituídos em mais de 90% dos casos por tumores epidermóides. E destes casos, a tonsila palatina é o local anatômico mais envolvido⁵.

Nos últimos 30 anos, a incidência do CEO vem aumentando em todo o mundo, apesar da diminuição na incidência dos outros tumores malignos de cabeça e pescoço⁵⁻¹³. Nos Estados Unidos da América (EUA), Chaturvedi *et al.*⁸ identificaram que a incidência anual de tumores da orofaringe aumentou 1 a 3% em base de língua e em até 6% em tonsila palatina entre 1973 e 2004.

Na Finlândia, a taxa de incidência padronizada por idade de câncer de tonsila palatina dobrou entre 1956 e 2000, tanto em homens como em mulheres⁶. Igualmente, há estudos recentes que revelam um aumento da incidência desse tipo de neoplasia maligna no Brasil¹³, na Suécia⁹, Holanda¹⁰ e Reino Unido¹¹. Curiosamente, apesar da diminuição do tabagismo nas últimas décadas, ocorreu um aumento na incidência de CEO, justificando a existência de outros fatores envolvidos na gênese deste tipo de câncer^{6,12}.

Hocking *et al.*¹² identificaram que, entre os anos de 1982 e 2005, ocorreu um aumento significativo na incidência anual dos tumores de tonsila palatina e de base de língua na Austrália. Por outro lado, entre os anos 1930-1940, a prevalência de tabagismo na população adulta era de aproximadamente 70%, reduzindo para 17% em 2007.

O tabagismo, o etilismo, a má higiene oral e as características genéticas são fatores de risco reconhecidos para os tumores de cabeça e pescoço^{12,17}. Entretanto, em até 25% dos casos, estes fatores não estão claramente presentes⁴.

Mais recentemente, o aumento nos casos de CEO tem sido relacionado à infecção pelo HPV. Pesquisas realizadas nos últimos 15 anos têm demonstrado que o HPV causa um tipo de CEO que acomete, sobretudo, pacientes masculinos jovens, caucasóides, com um melhor prognóstico e maior sobrevida quando

comparado aos casos negativos para o HPV^{6,8,16}. Os pacientes com CEO HPV positivo são, geralmente, 5 a 10 anos mais jovens do que os pacientes portadores da neoplasia com os fatores de risco mais típicos³³.

A infecção pelo HPV foi reconhecida como um fator de risco independente para essa neoplasia¹⁷. No trato anogenital, a importância do papel do HPV na carcinogênese já é conhecida há alguns anos^{5,15,45}. Mais de 100 subtipos de HPV já foram identificados até o momento e mais de 13 subtipos foram associados a cânceres humanos. Os subtipos de HPV classificados como de alto risco carcinogênico são: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 e 73. Os demais subtipos são classificados como de baixo risco ou não carcinogênicos^{5,15}.

A infecção pelo HPV, principalmente no trato genital, é comum na população mundial e a sua incidência varia bastante com a idade e o sexo^{45,46}. Dunne *et al.*⁴⁶, ao realizar um estudo de coorte de mulheres nos EUA, identificaram que a incidência geral do HPV na região vaginal foi de 28,8% e essa taxa aumentou para 44,8% entre a faixa etária de 20 a 24 anos. Em um estudo prospectivo com homens entre 18 e 70 anos, Giuliano *et al.*⁴⁷ encontraram que 50% dos pacientes apresentavam pelo menos 1 subtipo de HPV na região genital.

Estudos realizados em diversas regiões geográficas indicam que 50 a 80% das mulheres sexualmente ativas serão infectadas na região genital por um ou mais subtipos de HPV em algum momento de suas vidas^{45,46}. Porém, na grande maioria dos casos, a infecção é apenas transitória, sendo provavelmente controlada pelo sistema imune^{5,48}.

Com relação à prevalência da infecção pelo HPV na mucosa oral e na orofaringe de indivíduos saudáveis, os resultados são ainda inconclusivos^{18-26,49,50}. Da mesma forma, estudos que analisaram a associação entre a infecção pelo HPV e o CEO também apresentaram resultados conflitantes^{8,16, 28-36,51}

Essa variabilidade nos resultados parece decorrer, ao menos em parte, do uso de distintos métodos utilizados na detecção do HPV e das características da amostra analisada¹⁹. Outro fator que contribui para a variabilidade de prevalência é a

ausência de uma padronização dos sítios anatômicos analisados nos estudos. Em alguns, a prevalência é calculada com base em dados gerais para tumores epidermóides da região de cabeça e pescoço^{16,34,52}. Em outros, os tumores de orofaringe e de boca são agrupados como um mesmo sítio, ainda que haja dados sugestivos de que o CEO apresenta uma maior prevalência de HPV em comparação à boca e à laringe³⁸.

A maior frequência do HPV na orofaringe provavelmente decorre da justaposição entre o epitélio escamoso e o tecido linfóide e da mucosa não queratinizada que facilitaria o acesso do vírus à camada basal do epitélio. Esta justaposição assemelha-se à junção escamocolunar do colo uterino, onde há uma elevada prevalência de câncer associado ao HPV²⁴.

Os métodos hoje em dia mais utilizados para a detecção do HPV são a PCR, a HIS e a imunoistoquímica^{17,19,30,32,37-39}. Apesar dos avanços epidemiológicos e clínicos na determinação do HPV como um causador do CEO, não existe nenhum teste comercialmente disponível, validado e universalmente aceito para determinar o status do HPV^{17,19,30,32,37-39}.

A frequência do HPV na mucosa oral e orofaríngea normal apresenta resultados bem variados, chegando a valores entre 0 a 100% em algumas revisões de literatura²². Alguns autores sugerem que a prevalência da infecção pelo HPV em pacientes saudáveis é de 0 a 6,34%^{23,25} em crianças e adolescentes e de 0 a 41% em adultos^{2,4,18,19,21,22,26,49,51}. Kreimer *et al.*²⁰, em uma revisão sistemática de 18 estudos com pacientes saudáveis com idade entre 3 e 85 anos, verificaram que 4,5% dos indivíduos apresentavam qualquer tipo de HPV, 3,5% apresentavam algum HPV carcinogênico e 1,3% apresentavam o HPV 16 na mucosa oral. Todos os estudos utilizaram o enxágue bucal, o escovado da mucosa ou a saliva como amostra. Nenhum destes pesquisadores analisou amostra histológica.

Em outro estudo, agora multicêntrico realizado no Brasil, México e EUA, Kreimer *et al.*¹⁸ identificaram uma prevalência de 4,0% do HPV na região oral de homens saudáveis entre 18 e 74 anos de idade. Estratificando-se por país, a prevalência foi de 2,1% no Brasil, 5,9% no México e 3,6% nos EUA. A amostra

analisada foi de enxágue bucal e o método empregado foi a identificação do ácido desoxirribonucléico (DNA) viral pela PCR.

Em um estudo de 2012 na Suécia, Du *et al.*²¹ encontraram uma prevalência de 9,3% do HPV em amostras de enxágue bucal com extração do DNA viral. A população estudada foi de homens e mulheres saudáveis entre 15 e 23 anos de idade.

Ernster *et al.*¹⁹ não identificaram nenhum caso de HPV entre as amostras de blocos de parafina de 226 pacientes saudáveis com idade igual ou superior a 21 anos. O método empregado na análise foi a PCR qualitativa. Esse mesmo grupo de pesquisadores americanos já havia realizado um estudo em 2007 com o mesmo método de análise dos blocos de parafina, mas avaliando apenas pacientes com CEO. Em 72 pacientes estudados, a prevalência do HPV 16 foi de 69% (50 casos)⁷.

Em um estudo desenvolvido no Brasil, Esquenazi *et al.*²² coletaram material de mucosa oral por raspado com escova e analisaram a amostra pelo método da PCR. Foram estudados 100 pacientes sadios com idades entre 20 e 31 anos. Os resultados mostraram ausência de HPV em todas as amostras. Em outro estudo brasileiro, realizado em uma amostra de 100 crianças entre 2 e 13 anos de idade, Ribeiro *et al.*²³ avaliaram a presença do HPV em amostras de tonsila palatina ressecadas cirurgicamente. O método utilizado foi a PCR e nenhum deles foi positivo para o HPV. Também no Brasil, Do Sacramento *et al.*²⁴ detectaram a presença do HPV na orofaringe de indivíduos saudáveis em 14% dos casos. A idade dos pacientes variou entre 16 e 52 anos, a amostra utilizada foi o raspado de células da orofaringe e a determinação da presença do DNA viral foi realizada pela PCR.

Na Turquia, Baloglu *et al.*²⁵ encontraram uma prevalência de 6,34% do HPV em 252 blocos de parafina de tonsila palatina e faríngea de pacientes operados por obstrução de via aérea. A técnica utilizada foi a da PCR, a idade dos pacientes variou entre 5 e 21 anos e, dos 16 casos positivos, 11 foram positivos para o HPV 16.

Chen *et al.*²⁶ determinaram a prevalência do HPV em tonsilas palatinas ressecadas cirurgicamente por hipertrofia ou por tonsilites de repetição e em células esfoliadas de pacientes com tonsilas normais. A identificação do DNA viral foi realizada pela PCR. Os autores encontraram uma prevalência de 6,3% nos casos operados e de 0,6% nos casos de células esfoliadas. Em outro estudo europeu, Klingenberg *et al.*⁴⁹ avaliaram a presença do HPV em amostras de tecido em bloco de parafina de tonsilas de pacientes submetidos a tonsilectomia por tonsilites de repetição ou roncocalos por hipertrofia de tonsilas. Dos 195 casos analisados pelo método da PCR, somente 2 casos (1%) foram positivos para o HPV 16 e 18. Os resultados de alguns trabalhos relacionados à prevalência do HPV em pacientes sem neoplasia maligna encontram-se resumidos na tabela 2.

Tabela 2. HPV em pacientes sem neoplasia maligna

Autor, ano	Sexo	Faixa etária	Localização	Material analisado	Técnica	Nº total	Prevalência	Tipos de HPV
Maitland <i>et al.</i> , 1987	M e F	NC	Região oral	Tecido fresco	HIS	12	41%	AR
Chen <i>et al.</i> , 2005	M e F	1-72 anos	Tonsila palatina	Tecido fresco	PCR	206	6,3%	AR
Do Sacramento <i>et al.</i> , 2006***	M e F	16 - 52 anos	Orofaringe	Raspado com escova	PCR	50	14%	AR
Ribeiro <i>et al.</i> , 2006***	M e F	2 - 13 anos	Tonsila palatina	Tecido fresco	PCR	100	0%	NC
Andrews <i>et al.</i> , 2009**	M e F	56 anos*	Região oral e orofaringe	Bloco de parafina	PCR	12	25%	AR
Ernster <i>et al.</i> , 2009	M e F	> 21 anos	Tonsila palatina	Bloco de parafina	PCR	226	0%	AR
Baloglu <i>et al.</i> , 2010	M e F	5 - 21 anos	Tonsila palatina e faríngea	Bloco de parafina	PCR	252	6,34%	BR e AR
Esquenazi <i>et al.</i> , 2010***	M e F	20 - 31 anos	Região oral	Raspado com escova	PCR	100	0%	NC
Klingenberg <i>et al.</i> , 2010	M e F	12- 70 anos	Tonsila palatina	Bloco de parafina	PCR	195	1%	AR
Kreimer <i>et al.</i> , 2011	M	18 - 74 anos	Região oral	Enxágue bucal	PCR	1680	4%	BR e AR
Du <i>et al.</i> , 2012	M e F	15 - 23 anos	Região oral	Enxágue bucal	PCR	483	9,3%	BR e AR

M = masculino; F = feminino; PCR = reação em cadeia da polimerase; BR = baixo risco; AR = alto risco; NC = não classificado; HIS= hibridização in situ

*idade média; **estudo com pacientes não tabagistas e não etilistas; ***estudos brasileiros

Com relação aos estudos que avaliaram a prevalência do HPV em tecidos neoplásicos, Dayyani *et al.*¹⁶ publicaram uma metanálise no ano de 2010 que

analisou 34 estudos e encontrou uma prevalência de 21,95% do HPV em CE de cabeça e pescoço. O tipo viral mais encontrado foi o HPV 16, representando 86,69% de todos os casos HPV positivos. Analisando somente os estudos que avaliaram o CEO, a prevalência do HPV foi de 41%. Em outra metanálise, Jayaprakash *et al.*²⁸ avaliaram 22 estudos que correlacionaram a presença do HPV 16 e 18 à displasia epitelial de cavidade oral e de orofaringe e verificaram uma frequência de 24,5% do vírus no tecido.

Em 2010, Ang *et al.*²⁹ observaram que, ao utilizar a técnica de HIS em amostras em bloco de parafina, 206 pacientes de um grupo de 323 casos com CEO foram positivos para o HPV (63,8%). Dos casos positivos, 96,1% foram positivos para o subtipo 16 (198 casos). Andrews *et al.*⁴, em um estudo de caso-controle, observaram que entre os pacientes não tabagistas e não etilistas, os casos de CEO foram 6,1 vezes mais propensos de apresentar o HPV quando comparados ao grupo controle – sem neoplasia maligna.

Lee *et al.*³⁰, descrevendo uma série de pacientes não tabagistas e não etilistas com CE de cabeça e pescoço, verificaram que 10% das amostras foram positivas para o HPV. Todos os casos positivos eram de tumores de tonsila palatina. A amostra consistia de blocos de parafina (22 peças) e a técnica utilizada foi a de HIS.

O CEO relacionado ao HPV é caracterizado pela expressão das proteínas E6 e E7. A proteína E6 inativa a proteína supressora tumoral P53, considerada uma guardiã do genoma por detectar alterações no DNA e conseqüentemente realizar a apoptose celular. Do mesmo modo, a proteína E7 inativa a proteína supressora tumoral RB (retinoblastoma)^{17,45,53,54,55}. Figura 1.

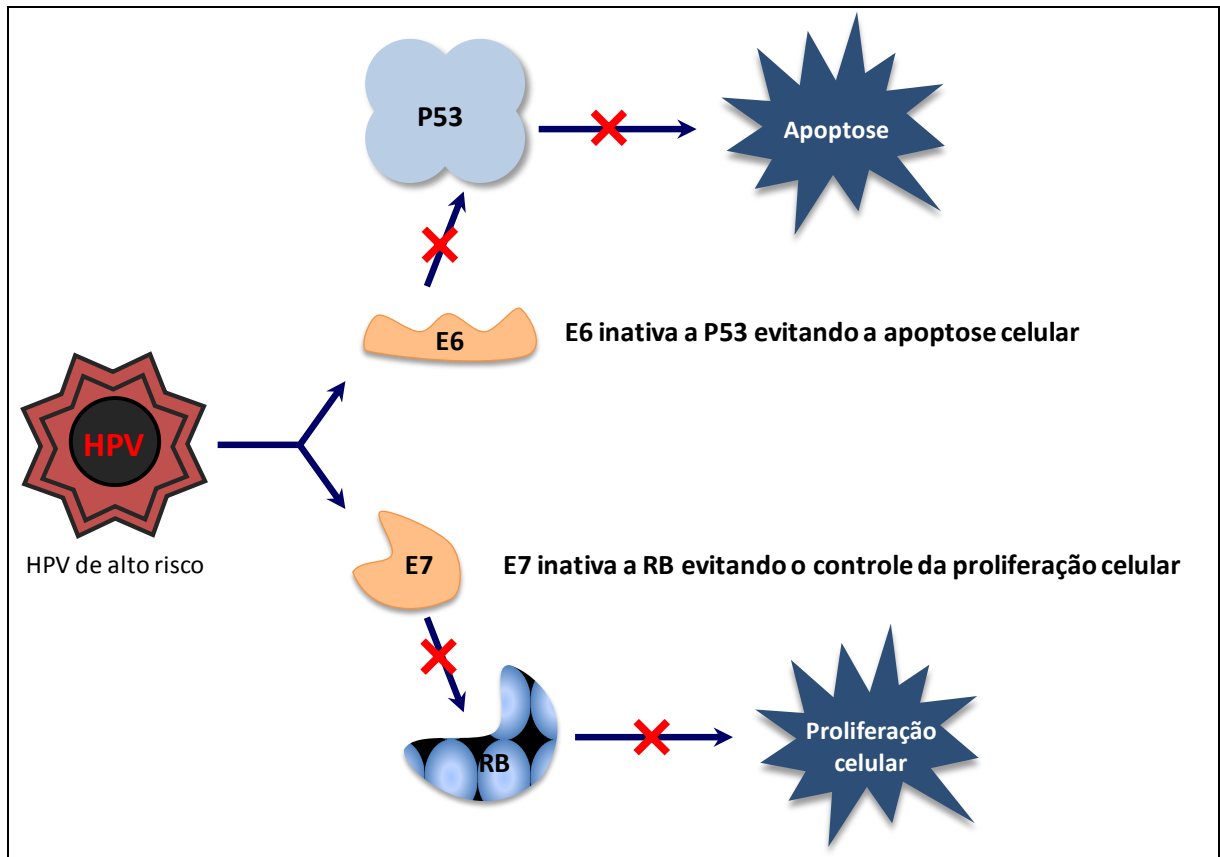


Figura 1. Atividade do HPV de alto risco. Adaptado de: <http://genetics.thetech.org>

A proteína RB ativada controla a proliferação celular e funciona normalmente como uma reguladora negativa da expressão da proteína P16 (proteína supressora tumoral codificada pelo gene *CDKN2A* localizado no cromossomo 9p21). A oncoproteína E7 causa degradação e inativação da proteína RB, prevenindo-a de se ligar ao fator de transcrição E2F e, portanto, promove a progressão do ciclo celular de modo descontrolado^{53,54,56}. Conseqüentemente, uma inativação da função da proteína RB causa uma superexpressão da P16. Portanto, o CEO associado ao HPV apresenta uma superexpressão da P16 nuclear e citoplasmática, o que normalmente não ocorre nos casos de CEO HPV negativo. Em decorrência disso, vários autores têm utilizado a imunistoquímica para P16 como um marcador substituto para a expressão da proteína E7, indicando que o HPV está ativo na célula^{17,37,45,52-55}.
 Figura 2.

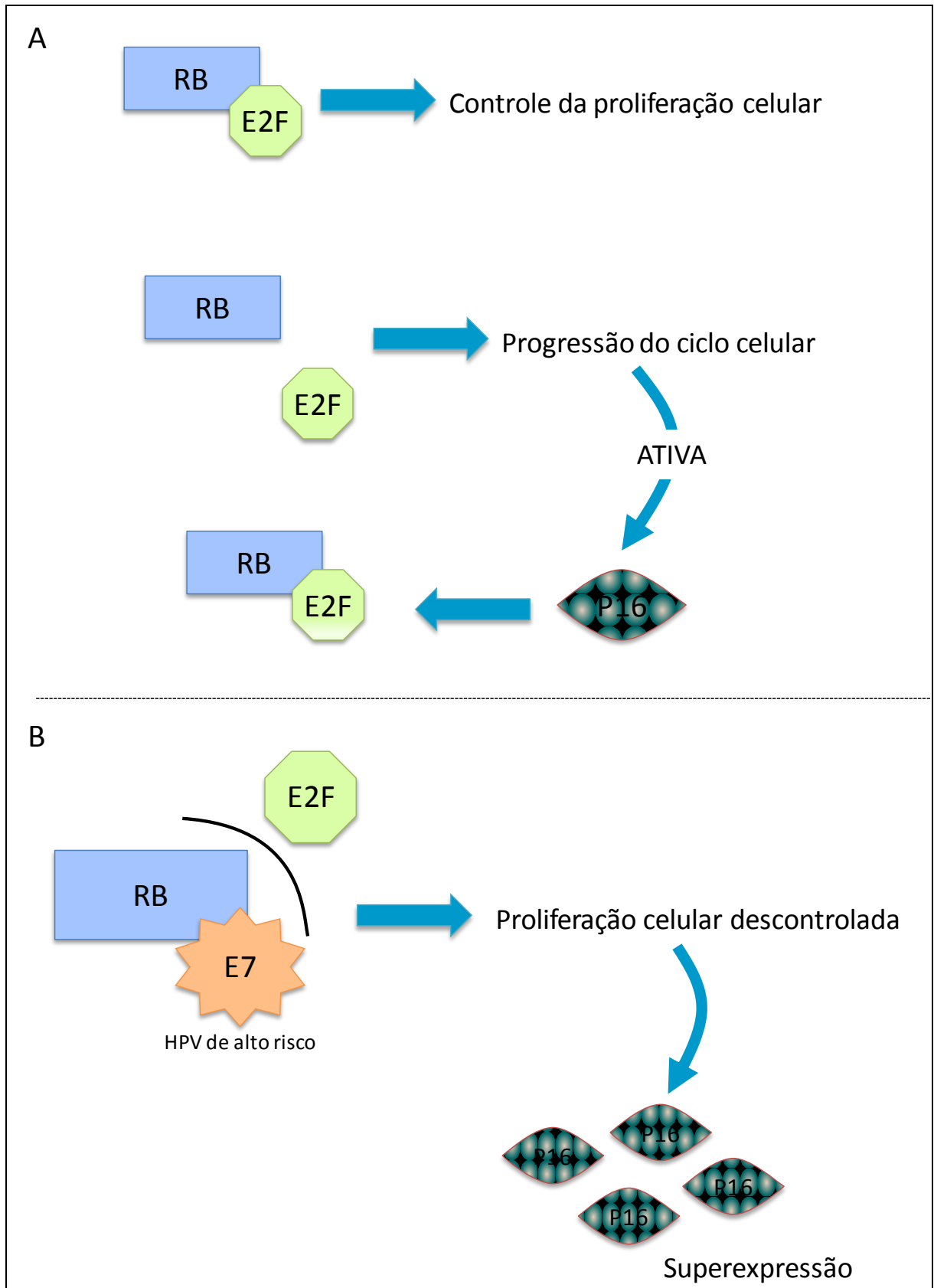


Figura 2. **A:** Regulação fisiológica do controle celular. **B:** Transformação oncogênica mediada pelo HPV de alto risco. Adaptado de: <http://www.mtmlabs.com>

Smeets *et al.*³¹ compararam vários métodos na detecção do HPV em amostras de CE de cabeça e pescoço de 48 pacientes. Ao utilizar a expressão das proteínas E6/E7 em biópsias de tecido fresco como padrão ouro do envolvimento viral na carcinogênese, os autores observaram que a imunistoquímica para P16 apresentou uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 79% enquanto que a HIS fluorescente para HPV 16 e 18 apresentou 83% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Em um estudo publicado em 2012, Jordan *et al.*³² compararam a imunistoquímica para P16 e a HIS para HPV - AR com a expressão das proteínas E6/E7 nos CEO, este último considerado pelos autores como o método padrão ouro para definir um tumor como causado pelo HPV. A imunistoquímica apresentou uma maior sensibilidade (96,8%) do que a HIS (88%), enquanto a HIS apresentou uma especificidade maior (94,7%) do que a imunistoquímica (83,8%). A taxa de concordância entre os dois métodos foi de 88,6%.

Singhi *et al.*³⁴ compararam a HIS para HPV16 e a imunistoquímica para P16 em amostras de material em bloco de parafina de 256 pacientes com CE de cabeça e pescoço. Eles encontraram uma correlação de 93% entre os dois métodos estudados. Ma *et al.*³³ compararam os resultados obtidos através da imunistoquímica para P16 em material de biópsia do tumor versus a peça cirúrgica com o objetivo de avaliar o papel da quantidade de material histológico na expressão da P16. Houve uma correlação entre os grupos de 87% (28/32).

Thavaraj *et al.*³⁵ avaliaram a presença do HPV em CE de tonsila palatina de material em bloco de parafina e observaram que a combinação da imunistoquímica para P16 e HIS para HPV - AR classificou 53% das amostras como HPV positivas, enquanto a concordância entre os dois métodos empregados foi de 83,3%. Fischer *et al.*⁴¹ encontraram uma positividade para P16 em 41,17% dos casos em uma amostra de 85 blocos de parafina de pacientes com CEO.

No Reino Unido, Heath *et al.*⁴² verificaram que 37% dos pacientes com CE de cabeça e pescoço foram positivos para a imunistoquímica para P16. Analisando

somente os tumores de tonsila palatina, 79% mostraram evidência da presença do HPV.

Com relação aos estudos realizados no Brasil, Acay *et al.*³⁸ avaliaram a prevalência do HPV em 50 amostras de blocos de parafina de lesões bucais pré-malignas e malignas pela técnica de HIS, encontrando uma positividade em 24% delas. Silva *et al.*⁵⁷ observaram que 53,3% dos carcinomas epidermóides de orofaringe e laringe foram positivos para a expressão da P16. Kaminagakura *et al.*⁵⁸ estudaram somente o CE de boca e encontraram uma positividade para P16 em 22% dos casos e uma prevalência de HPV – AR de 19,2% pelo método da PCR. A tabela 3 apresenta alguns resultados encontrados na literatura com relação à prevalência do HPV em pacientes com CE.

Tabela 3. HPV em pacientes com carcinoma epidermóide

Autor, ano	Faixa etária	Localização	Material analisado	Técnica	Nº amostra	Prevalência	Tipos de HPV
Acay et al., 2008	NC	Boca	Bloco de parafina	HIS	10	30%	AR
Lee et al., 2008**	64 anos*	Cabeça e pescoço	Bloco de parafina	HIS	22	10%	AR
Andrews et al., 2009**	56 anos*	Cavidade oral e orofaringe	Bloco de parafina	PCR	18	78%	AR
Ang et al., 2010	31 - 82 anos	Orofaringe	Bloco de parafina	HIS	323	63,8%	AR
Fischer et al., 2010	NC	Orofaringe	Bloco de parafina	P16	85	41,1%	NC
Singhi et al., 2010	10 - 82 anos	Cabeça e pescoço	Bloco de parafina	P16	256	76%	NC
				HIS	256	69%	16
Thavaraj et al., 2011	36- 81 anos	Tonsila palatina	Bloco de parafina	HIS e P16	142	53%	AR
Heath et al., 2012	35 - 92 anos	Cabeça e pescoço	Bloco de parafina	P16	83	37%	NC
Jordan et al., 2012	NC	Orofaringe	Bloco de parafina	P16	231	70,2%	NC
				HIS	232	60,9%	16
Kaminagakura et al., 2012***	20 - 82 anos	Boca	Bloco de parafina	P16	99	22,2%	NC
				PCR	114	19,2%	AR
Silva et al., 2012***	21 - 76 anos	Orofaringe e laringe	Bloco de parafina	P16	75	53,3%	NC

M = masculino; F = feminino; HIS= hibridização in situ; PCR = reação em cadeia da polimerase; P16= imunistoquímica para P16; BR = baixo risco; AR = alto risco; NC = não classificado

*idade média; **estudo com pacientes não tabagistas e não etilistas; ***estudos brasileiros

A PCR apresenta uma maior sensibilidade quando realizada em material fresco, por apresentar uma menor probabilidade de degradação do DNA viral. Por outro lado, a vantagem da HIS é que a mesma pode ser utilizada em tecido arquivado em bloco de parafina, assim como a imunistoquímica para P16^{2,17,19,37,53,52}. A HIS apresenta algumas vantagens em relação à técnica que utiliza a PCR. A introdução de várias etapas de amplificação de sinal melhorou significativamente a sua sensibilidade, podendo-se detectar até 1 cópia viral por célula. Já a utilização de amostras em material em bloco de parafina permite a realização de estudos retrospectivos^{34,37}.

Para diminuir a variabilidade técnica e melhorar a interpretação da HIS, métodos de imagem automatizados foram recentemente incorporados aos testes laboratoriais. Já a imunistoquímica apresenta a vantagem de ser um teste normalmente disponível nos laboratórios de patologias cirúrgicas, sendo relativamente padronizada, de fácil realização e podendo ser um marcador indireto da atividade do vírus na célula^{31,37}.

A detecção do DNA viral isoladamente não significa que o vírus tenha uma associação causal com o câncer. Consequentemente a imunistoquímica para P16 está sendo considerada como um marcador substituto da atividade viral na célula. A superexpressão de P16 está fortemente relacionada à infecção ativa pelo HPV baseado no conceito de que a inativação da proteína RB pela proteína E7 do vírus induz a um aumento da P16^{6,31,55,59}.

Estudos mostram que a maioria das infecções pelo HPV são combatidas pelo sistema imune em até 2 anos^{45,56,60}. Ao final do primeiro ano, 66% das infecções já foram solucionadas. Essa taxa aumenta para 90% aos 2 anos da infecção. Já foi demonstrado que o sistema imune pode levar até o dobro do tempo para combater o HPV 16 em comparação aos outros HPV carcinogênicos e que, na região de cabeça e pescoço, o HPV 16 é o mais encontrado em pacientes com CEO^{47,56}.

Considerando que o conhecimento sobre a história natural das neoplasias da orofaringe induzida pelo HPV é ainda limitado^{5,24}, e que o status do HPV no tumor

parece impactar na história natural da doença e na resposta ao tratamento^{17,42,43,59}, torna-se imperioso que novos estudos sobre a prevalência do HPV sejam realizados.

Nesta dissertação, foi estudada a frequência do HPV em uma amostra de pacientes portadores de CEO e em pacientes sem neoplasia maligna, utilizando as técnicas de HIS e imunohistoquímica para P16 para avaliar a prevalência do HPV nesses dois grupos. Foi também avaliado a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre a positividade para o HPV e a localização do tumor na orofaringe, o estadiamento clínico e o grau de diferenciação tumoral.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo principal

O objetivo do presente estudo é verificar a frequência do HPV utilizando as técnicas de imunistoquímica para P16 e hibridização *in situ* cromogênica (CISH), como métodos isolados ou combinados, em pacientes com CEO e em pacientes sem neoplasia maligna e avaliar a existência de uma diferença estatisticamente significativa na frequência do HPV entre os dois grupos.

3.2 Objetivos secundários

Avaliar a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre a positividade para o HPV e a localização do tumor na orofaringe, o estadiamento clínico e o grau de diferenciação tumoral.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013 Jan;63(1):11–30.
2. Danenberg PV, Grimminger CM. Update of prognostic and predictive biomarkers in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268:05–16.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. [Acesso em 02 de novembro de 2012]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>
4. Andrews E, Seaman WT, Webster-Cyriaque J. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. *Oral Oncol.* 2009 Jun;45(6):486–91.
5. Joseph AW, D'Souza G. Epidemiology of human papillomavirus-related head and neck cancer. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2012 Aug;45(4):739–64.
6. Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *Journal of Clinical Pathology.* 2004 May 1;57(5):449–55.
7. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, Finch JL, Robinson LJ, Willson T, et al. Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *Laryngoscope.* 2007 Dec;117(12):2115–28.
8. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J. Clin. Oncol.* 2008 Feb 1;26(4):612–9.
9. Hammarstedt L, Dahlstrand H, Lindquist D, Onelöv L, Ryott M, Luo J, et al. The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing. *Acta Otolaryngol.* 2007 Sep;127(9):988–92.
10. Braakhuis BJM, Visser O, Leemans CR. Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults.

Oral Oncol. 2009 Sep;45(9):e85–89.

11. Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya KAAS, Ogden G, Macpherson LMD. Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. *Oral Oncol.* 2006 Jul;42(6):586–92.

12. Hocking JS, Stein A, Conway EL, Regan D, Grulich A, Law M, et al. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br. J. Cancer.* 2011 Mar 1;104(5):886–91.

13. Biazevic MGH, Castellanos RA, Antunes JLF, Michel-Crosato E. [Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002]. *Cad Saude Publica.* 2006 Oct;22(10):2105–14.

14. 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 Dec;12(6):418–24.

15. International Agency for Research on Cancer [homepage na internet]. Human Papillomaviruses 1995 [acesso em 01 nov 2012]. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol64/mono64.pdf>

16. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho C-H, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & Neck Oncology.* 2010;2(1):15.

17. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010 Aug;11(8):781–9.

18. Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2011 Jan;20(1):172–82.

19. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, Robinson LJ, Willson T. Prevalence of oncogenic human papillomavirus 16 and 18 in the palatine tonsils of the general adult

population. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2009 Jun;135(6):554–7.

20. Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis.* 2010 Jun;37(6):386–91.

21. Du J, Nordfors C, Ahrlund-Richter A, Sobkowiak M, Romanitan M, Näsman A, et al. Prevalence of oral human papillomavirus infection among youth, Sweden. *Emerging Infect. Dis.* 2012 Sep;18(9):1468–71.

22. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho M da G da C, Barros FS de. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010 Feb;76(1):78–84.

23. Ribeiro KMX, Alvez JM, Pignatari SSN, Weckx LLM. Detection of human papilloma virus in the tonsils of children undergoing tonsillectomy. *Braz J Infect Dis.* 2006 Jun;10(3):165–8.

24. Do Sacramento PR, Babeto E, Colombo J, Cabral Ruback MJ, Bonilha JL, Fernandes AM, et al. The prevalence of human papillomavirus in the oropharynx in healthy individuals in a Brazilian population. *J. Med. Virol.* 2006 May;78(5):614–8.

25. Baloglu H, Kuçukodaci Z, Gungör A, Haholu A, Cincik H, Yasa Yan G, et al. Human Papilloma Virus Prevalence in Hyperplastic Tonsils and Adenoids in Children and Young Adults. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2010;30(2):528–32

26. Chen R, Sehr P, Waterboer T, Leivo I, Pawlita M, Vaheiri A, et al. Presence of DNA of human papillomavirus 16 but no other types in tumor-free tonsillar tissue. *J. Clin. Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1408–10.

27. St Guily JL, Clavel C, Okaïs C, Prétet J-L, Beby-Defaux A, Agius G, et al. Human papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers. *Head Neck Oncol.* 2011;3(1):6.

28. Jayaprakash V, Reid M, Hatton E, Merzianu M, Rigual N, Marshall J, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncol.* 2011 Nov;47(11):1048–54.

29. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al.

Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med.* 2010 Jun 10;363(1):24–35.

30. Lee WT, Tubbs RR, Teker AM, Scharpf J, Strome M, Wood B, et al. Use of in situ hybridization to detect human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma patients without a history of alcohol or tobacco use. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008 Oct;132(10):1653–6.

31. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-JM, Haesevoets A, Snijders PJF, Pawlita M, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int. J. Cancer.* 2007 Dec 1;121(11):2465–72.

32. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, He X, Pickard R, Koluder M, et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012 Jul;36(7):945–54.

33. Ma C, Lewis J Jr. Small biopsy specimens reliably indicate p16 expression status of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2012 Jun;6(2):208–15.

34. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer.* 2010 May 1;116(9):2166–73.

35. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J. Clin. Pathol.* 2011 Apr;64(4):308–12.

36. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2007 May 10;356(19):1944–56.

37. Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Nuovo GJ, Li M, Dunne A, Kawachi N, et al. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod. Pathol.* 2011 Oct;24(10):1295–305.

38. Acay R, Rezende N, Fontes A, Aburad A, Nunes F, Sousa S. Human papillomavirus as a risk factor in oral carcinogenesis: a study using in situ hybridization with signal amplification. *Oral Microbiol. Immunol.* 2008 Aug;23(4):271–4.
39. Cohan DM, Popat S, Kaplan SE, Rigual N, Loree T, Hicks WL Jr. Oropharyngeal cancer: current understanding and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009 Apr;17(2):88–94.
40. Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, Green E, Tornillo L, Lugli A, et al. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann. Oncol.* 2010 Oct;21(10):1961–6.
41. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int. J. Cancer.* 2010 Mar 1;126(5):1256–62.
42. Heath S, Willis V, Allan K, Purdie K, Harwood C, Shields P, et al. Clinically significant human papilloma virus in squamous cell carcinoma of the head and neck in UK practice. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2012 Feb;24(1):e18–23
43. World Health Organization [homepage na internet]. [Acesso em 02 de novembro de 2012]. Disponível em: http://www.who.int/gho/ncd/mortality_morbidity/cancer_text/en/index.html
44. Instituto Nacional de Câncer – INCA [homepage na Internet]. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 1996-2012. [Acesso em 02 de novembro de 2012]. Estimativa de Câncer 2012. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>
45. Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol. Oncol.* 2007 Nov;107(2 Suppl 1):S2–5.
46. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA.* 2007 Feb 28;297(8):813–9.

47. Giuliano AR, Lee J-H, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet*. 2011 Mar 12;377(9769):932–40.
48. Instituto Nacional do Câncer [homepage na internet]. [Acesso em 24 abr 2012]. Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=327
49. Klingenberg B, Hafkamp HC, Haesevoets A, Manni JJ, Slootweg PJ, Weissenborn SJ, et al. p16INK4A overexpression is frequently detected in tumour-free tonsil tissue without association with HPV. *Histopathology*. 2010 Jun 1;56(7):957–67.
50. Castro TPPG, Bussoloti Filho I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006 Apr;72(2):272–82.
51. 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 Sep;56(3):245–50.
52. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, Chaturvedi AK, D'Souza G, Gravitt PE, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck*. 2009 Nov;31(11):1393–422.
53. Langendijk JA, Psyrri A. The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Ann. Oncol*. 2010 Oct;21(10):1931–4.
54. Marklund L, Hammarstedt L. Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol*. 2011;2011:509036.
55. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin. Cancer Res*. 2009 Nov 15;15(22):6758–62.
56. Best SR, Niparko KJ, Pai SI. Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. *Otolaryngol. Clin. North*

Am. 2012 Aug;45(4):807–22.

57. Silva SD, Nonogaki S, Soares FA, Kowalski LP. p16 (INK4a) has clinicopathological and prognostic impact on oropharynx and larynx squamous cell carcinoma. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2012 Dec;45(12):1327–33.

58. Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int. J. Cancer.* 2012 Apr 15;130(8):1726–32.

59. Mannarini L, Kratochvil V, Calabrese L, Gomes Silva L, Morbini P, Betka J, et al. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2009 Jun;29(3):119–26.

60. Rautava J, Willberg J, Louvanto K, Wideman L, Syrjänen K, Grénman S, et al. Prevalence, genotype distribution and persistence of human papillomavirus in oral mucosa of women: a six-year follow-up study. *PLoS ONE.* 2012;7(8):e42171.

5. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

ORIGINAL ARTICLE

PREVALENCE OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS IN PATIENTS WITH OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND BENIGN DISEASE: A CASE-CONTROL STUDY

Carla Cuenca Schwartzmann¹, Gerson Schulz Maahs², Pedro Bandeira Aleixo³,
Lúcia Maria Kliemann⁴, Gustavo Cartaxo de Lima Gösling⁵, Daiane Oliveira Braga⁶,
Rosalva Meurer⁷, Gilberto Schwartzmann⁸

- 1- Otolaryngologist. Master's candidate, Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS School of Medicine.
- 2- MD. ScD in Medicine and Health Sciences, PUCRS. Assistant Professor, UFRGS Department of Otolaryngology and Ophthalmology.
- 3- MSc in Pathology. Doctoral candidate, Graduate Program in Pathology, UFCSPA.
- 4- MD. ScD in Internal Medicine, UFRGS. Professor, UFRGS Department of Pathology.
- 5- Medical student, UFRGS School of Medicine.
- 6- Resident, Department of Otolaryngology, PUCRS
- 7- Chemist. MSc in Pathology, UFCSPA
- 8- Professor, Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, UFRGS School of Medicine.

Abstract

Introduction: The incidence of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) has increased worldwide over the last 30 years. Studies have identified human papillomavirus (HPV) infection as a risk factor for OSCC. **Objectives:** To compare the frequency of HPV infection in patients with OSCC and patients with benign oral or oropharyngeal disease and ascertain whether a statistically significant difference in HPV frequency exists between these two groups. As a secondary objective, to assess potential correlations between HPV positivity, anatomic site of OSCC, tumor staging, and degree of tumor differentiation. **Methods:** Case-control study. The sample comprised 59 patients with OSCC and 54 non-OSCC controls who underwent surgery for benign oral or oropharyngeal conditions. Paraffin-embedded specimens from cases and controls were tested for HPV positivity by chromogenic *in situ* hybridization (CISH) for low-risk (LR) and high-risk (HR) HPV, and HPV activity was assessed by P16 immunohistochemistry (IHC). **Results:** The frequency of HPV positivity was higher in the case group than in the control group when assessed by P16 IHC alone (OR=10.3, $P<0.001$) or by CISH and P16 IHC in combination (OR=21.4, $P<0.001$). CISH alone did not detect any significant between-group difference in HPV frequency ($P=0.572$). Tumor site, staging, and differentiation did not correlate with HPV positivity with any of the methods employed ($P>0.20$). **Conclusion:** Using a P16 IHC assay alone or combined with CISH, the authors showed a higher rate of HPV positivity among patients with OSCC, as compared with patients with benign disease. Tumor site within the oropharynx, tumor stage, and degree of differentiation did not correlate with HPV positivity.

Key words: carcinoma, squamous cell; *in situ* hybridization; immunohistochemistry; oropharynx; human papillomavirus 16; palatine tonsil.

Introduction

Oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) accounts for 3–5% of all malignant neoplasms in the West^{1,2}. In 2008, 13,735 new cases of oropharyngeal cancer were reported in Brazil, with 7,354 deaths³. The American Cancer Society estimates that, in the U.S., 41,380 new cases of cancer of the oral cavity and pharynx and 7,890 deaths due to oropharyngeal neoplasms will occur in 2013¹.

Over the last 30 years, the incidence of OSCC has increased worldwide, despite a decline in the incidence of other head and neck cancers⁴⁻¹². In recent years, smoking—the main risk factor for OSCC—has lessened substantially in several developed and developing countries, which suggests an influence of other factors in the carcinogenesis of OSCC¹¹.

Recent studies have shown that HPV infection is a risk factor for OSCC, independent of other known risk factors such as smoking and alcohol intake. The molecular, epidemiologic, and clinical features of HPV-associated OSCC are distinct from those of non-HPV-related OSCC^{5,6,13}. HPV-positive OSCC usually occurs in younger patients, and is associated with better disease-free and overall survival rates^{5-7,13,14}.

HPV-associated OSCCs express the E6 and E7 oncoproteins. The E7 oncoprotein inactivates the RB (retinoblastoma) tumor suppressor protein, which acts as a negative regulator of expression of P16 – a tumor suppressor protein encoded by the *CDKN2A* gene. Consequently, HPV-positive tumors overexpress P16, unlike HPV-negative neoplasms¹⁴⁻²⁰.

Anogenital HPV infection is known to be common worldwide, but the majority of cases follow a self-limited course, with 90% resolving within 2 years of infection^{15,21-23}. Data on the prevalence of oral and oropharyngeal HPV infection in healthy individuals are still inconclusive^{14,24-32}. Accordingly, studies on the potential association between HPV infection and development of OSCC have also reported conflicting findings, with HPV prevalence rates ranging from 10% to 78% in head and neck tumor specimens^{7,13,33-41}.

This variability is at least partly attributable to the use of different methods for HPV detection, as well as to sample characteristics^{14,24,36,39}. Another factor that contributes to wide variation in prevalence findings is the absence of a standard for which anatomic sites are to be taken into account. Some studies have calculated prevalence on the basis of general data for all squamous-cell tumors of the head and neck^{13,20,39}. Others have pooled data for oropharyngeal and oral cavity tumors as a single site, despite evidence that OSCCs exhibit a higher prevalence of HPV positivity as compared with oral cavity and laryngeal tumors^{42,43}.

The greater frequency of HPV positivity in OSCC is probably due to the juxtaposition between squamous cell epithelium and lymphoid tissue/nonkeratinized mucosa, which would facilitate access by the virus to the basal layer of the mucosa. This juxtaposition is similar to that of the squamous-columnar junction of the cervix, where there is a high prevalence of HPV-related cancers³⁰.

Despite major progress in this field, there is no single standardized, validated, and universally accepted method for determination of HPV status^{14,19,25,35,37,42,44}. The most commonly used methods are the polymerase chain reaction (PCR), *in situ* hybridization (ISH), and P16 immunohistochemistry (IHC)^{14,19}.

In view of the limited current knowledge of the natural history of HPV-associated oropharyngeal neoplasms and of the fact that tumor HPV status appears to have an impact on natural history and treatment response, there is a pressing need for additional research into HPV prevalence^{4,14,16,25,30,43}. Recent clinical studies reported strong evidence of tumor HPV status as an independent prognostic factor in patients with OSCC^{34,45,46}. Expansion of the scientific knowledge base on this topic may play a major role in the development and implementation of future programs for prevention and early detection of OSCCs²⁵.

Within this context, the purpose of the present study was to ascertain the frequency of HPV infection among patients with OSCC treated at a university hospital in Southern Brazil and compare it with the frequency of HPV infection among patients with no oropharyngeal neoplasms. As a secondary objective, we will assess whether

tumor HPV status is associated with primary tumor site, stage, or degree of differentiation.

Materials and methods

Study design

A case-control study.

Study population

The study population comprised adult patients (age >18 years) who had undergone surgical procedures at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) between January 2007 and January 2012. This patient population was cross-referenced with the HCPA Department of Pathology database on the basis of histopathology findings (e.g. carcinoma) and anatomic site (e.g. oropharynx).

The sample was composed of three groups of patients who had already undergone a surgical procedure as part of their treatment: the case group, which comprised patients with OCSS, and two control groups, one (control group 1) consisting of patients with benign oropharyngeal conditions (such as tonsillar hypertrophy and recurrent tonsillitis) and one (control group 2) consisting of patients with benign oral lesions.

The variables of interest were sex, age, risk factors (smoking and alcohol intake), primary lesion site, tumor stage (according to the American Joint Committee on cancer staging system⁴⁷), and degree of differentiation (defined as well-differentiated, moderately differentiated, or poorly differentiated, according to World Health Organization criteria⁴⁸). All data were collected from patients' electronic medical records.

After patient selection, hematoxylin and eosin (H&E)-stained slides were reviewed by a pathologist (LMK) for confirmation of the original histopathological

diagnosis. Archived paraffin-embedded tissue specimens from each patient were then set aside for ISH and P16 IHC.

This study was approved by the HCPA Research Ethics Committee (project no. 120376).

Human papillomavirus *in situ* hybridization

ISH was performed by the chromogenic *in situ* hybridization (CISH) technique. Slices (3 μm thick) were obtained from paraffin-embedded specimens and mounted onto silanized slides. The slides were air-dried at 70°C for 10 minutes, dewaxed in xylol two times for 5 minutes each, and passed through 100% ethanol three times for 3 minutes each. The slides were then washed with 3% hydrogen peroxide for 10 minutes and rinsed with distilled water.

The proteolysis step was performed by enzymatic digestion (pepsin) in a humidified chamber and incubator at 37°C for 3 minutes. After rinsing with distilled water, slides were incubated in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) solution, pre-warmed to 95°C in a heated bath, for 15 minutes. Slides were then rinsed again with distilled water and any excess water gently dried off.

At room temperature, after vortexing, a 10- μL aliquot of ready-to-use ZytoFast® HPV Screening Probe (digoxigenin-labeled) (catalog no. T-1144-400, Zytovision, Germany) for detection of HPV-6/11/16/18/31/33/35 DNA was added to the center of the slide, which was then covered with a 22 x 22 mm coverslip (after running a bead of glue around the edges). Slides were then denatured on a hot plate at 75°C for 5 minutes and then moved to a humidified chamber for hybridization in an incubator at 37°C overnight. On the next day, coverslips were removed and slides were rinsed in Tris-buffered saline (TBS) (pre-warmed to 55°C for 5 minutes and at room temperature for 5 minutes).

Detection was performed with the commercially available ZytoFast PLUS CISH Polymer Detection Kit HRP-DAB (catalog no. T-1068-40, Zytovision, Germany) for visualization of digoxigenin-labeled probes, according to manufacturer instructions. The signal stain was 3,3'-diaminobenzidine (DAB), and the counterstain,

nuclear blue solution (ZytoFast PLUS CISH Polymer Detection Kit HRP-DAB Zytovision, Germany). The staining reaction was run for 3 minutes. Slides were then dehydrated in ethanol (four times for 2 minutes each) and xylol (two times for 2 minutes each), air-dried at room temperature, mounted with Canada balsam, and examined under light microscopy (Olympus BX41) at 40x and 400x magnification. Positive and negative controls were employed in each round of reactions.

Slides were considered positive for HPV DNA when brown-stained granules were visible in cell nuclei, regardless of staining intensity. All slides were assessed independently by two examiners: a qualified medical pathologist (PBA) and a trained pathology technologist (RM). Disagreements were addressed later by discussion and consensus.

P16 immunohistochemistry

Immunohistochemical testing for P16 expression was carried out by the labeled streptavidin–biotin/horseradish peroxidase (LSAB-HRP) method. Slices (3 µm thick) were obtained from paraffin-embedded specimens and mounted onto silanized slides. The slides were dewaxed in xylol and rehydrated in an alcohol series. Antigen recovery was performed by incubation of sections in citrate buffer (pH 6.0) in a heated bath (heat-induced antigen retrieval), followed by incubation in 5% hydrogen peroxide in methanol to block endogenous peroxidase.

Prior to primary antibody incubation, slides were treated in blocking buffer (5% nonfat milk powder in phosphate-buffered saline [PBS]) for 20 minutes to prevent nonspecific binding. The primary antibody, a mouse monoclonal anti-p16 (F-12) antibody (catalog no. SC1661, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) was diluted in PBS (1:200) and samples incubated overnight. For detection, samples were incubated in a commercially available LSAB+/HRP kit (Dako) according to manufacturer instructions.

Chromogenic staining was performed with DAB, and counterstaining, with hematoxylin. Positive and negative controls were used with all reactions. Positive and negative controls were obtained from cervix uteri tissue specimens with high grade

precursor lesions, with and without the primary antibody respectively. Slides were then examined under light microscopy (Olympus CX31), at 40x and 400x magnification, for the end product of the reaction, a dark brown precipitate within the cytoplasm and/or nucleus.

All specimens from the case group were examined in their epithelial areas, for invasive neoplasm, dysplastic epithelium, and non-dysplastic epithelium, and were classified according to the intensity, pattern, and predominant site of staining. Intensity of staining was graded as absent (0+), weak (1+), moderate (2+), or marked (3+), always on the basis of the highest intensity. Staining pattern was graded as: A, when no staining occurred; B, when 1% to 25% of cells were stained; C, when 26% to 50% of cells were stained; D, when 51% to 75% of cells were stained; and E, when 76% to 100% of cells were stained.

The predominant site of staining was classified as (a) nuclear, (b) cytoplasmic, or (c) cytoplasmic and nuclear. A slide was considered positive for p16 when there was at least moderate (2+) cytoplasmic or nuclear staining of at least 25% of cells, again taking into account the highest intensity visible. All slides were assessed independently by two pathologists (PBA and LMK) experienced in immunohistochemical methods. Disagreements were reassessed later.

Statistical analysis

Sample size calculation was based on a comparison of two estimated proportions. On the basis of previous studies, we estimated the proportion at 5% in the control group and 25% in the case group. According to the Pepi (Programs for Epidemiologists) 4.0 epidemiological software suite, for a statistical power of 0.80 and a significance level of 0.05, the suggested sample size was 59 patients in each group. This sample size was increased by 20% in each group to account for potential losses.

Quantitative variables were expressed as means and standard deviations. Categorical variables were expressed as absolute and relative frequencies. Analysis of variance (ANOVA) or Student's *t*-test were used for comparison of quantitative

data as appropriate depending on the number of groups involved. Fisher's exact test was used for comparison of categorical variables, followed by calculation of odds ratios (OR) as a measure of strength of association and their respective 95% confidence intervals. When ORs could not be calculated due to a frequency of zero, Agresti's correction (addition of 0.5 to each cell) was employed. ORs were adjusted for confounders by means of a logistic regression model constructed with sex, age, smoking, and alcohol intake as confounding factors. The level of significance was set at $\alpha=0.05$. All statistical analyses were carried out in the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 18.0 software environment.

Results

Of the 140 patients selected for the study, 15 were under the age of 18 years. Two patients had record numbers that did not correspond to their H&E slides and paraffin blocks, and paraffin-embedded specimens for 10 patients could not be found at the tissue archive. All (n=27) were excluded from the sample.

Of the 113 patients included in the sample, 40 were female and 73 were male. Age ranged from 19 to 81 years. Of the patients in whom the risk factors of smoking and alcohol intake was mentioned in records (97 and 92 patients respectively), 68% were smokers and 51% were alcoholics. These results are shown in table 1.

Table 1 – Case and control (1 and 2) group profiles.

	Control		Case n = 59	P
	Group 1 n = 22	Group 2 n = 32		
Age, years	35.9±14.4	49.8±14.1	58.1±9.2	<0.001
Female sex, n (%)	15 (68.2)	21 (65.6)	4 (6.8)	<0.001
Smoking, n (%)	3 (20.0)	11 (39.3)	52 (96.3)	<0.001
Alcoholism, n (%)	0 (0.0)	4 (16.0)	43 (82.7)	<0.001

Data expressed as mean ± standard deviation and n (%).

Regarding the case group, the palatine tonsils were the most common tumor site (49.2%), followed by the base of the tongue (28.8%). Tumor stage was mentioned in 36 of 59 records, and 64.9% of patients were classified as stage IV. The degree of tumor differentiation was mentioned in 56 records, and 78.6% of tumors were moderately differentiated. These findings are shown in table 2.

Table 2 – Tumor characteristics of patients in the case group

<u>Site</u>	<u>n = 59</u>
Palatine tonsil	29 (49.2)
Base of tongue	17 (28.8)
Soft palate	11 (18.6)
Posterior wall	2 (3.4)
<u>Stage</u>	<u>n = 36</u>
I	5 (13.9)
II	1 (2.8)
III	5 (13.9)
IV	25 (64.9)
<u>Degree of Differentiation</u>	<u>n = 56</u>
Well-differentiated	2 (3.6)
Moderately differentiated	44 (78.6)
Poorly differentiated	10 (17.9)

Data expressed as n (%).

CISH was performed on all samples (113 paraffin-embedded specimens). However, 10 specimens had insufficient material for immunohistochemical analysis.

Consequently, IHC was performed on 103 specimens. Table 3 shows the frequency of HPV in cases and controls as detected by P16 IHC, CISH, or both methods in combination, as well as odds ratios (ORs) and their respective confidence intervals.

Table 3 – HPV positivity in the control (1 and 2) and case groups as detected by P16 IHC, CISH, or combinations thereof, with crude and adjusted odds ratios.

	Controls			Cases	Univariate analysis			Multivariate analysis
	Group 1	Group 2	Total		OR ₁	OR ₂	OR _t	OR _{tc}
P16 IHC	n = 19 5.3	n = 31 16.1	n = 50 12.0	n = 53 58.5	25.4 (3.1–204.3) P<0.001	7.3 (2.4–22.1) P<0.001	10.3 (3.8–28.5) P<0.001	7.5 ^a (1.4–40.4) P=0.018
CISH	n = 22 63.6	n = 32 28.1	n = 54 42.6	n = 59 49.2	0.55 (0.22–1.51) P=0.319	2.5 (1.0–6.2) P=0.075	1.3 (0.6–2.7) P=0.572	3.7 ^b (0.8–17.1) P=0.091
P16 IHC or CISH	n = 22 63.6	n = 32 43.8	n = 54 51.9	n = 59 72.9	1.5 (0.5–4.4) P=0.426	3.5 (1.4–8.5) P=0.012	2.5 (1.1–5.5) P=0.032	4.4 ^c (1.0–19.9) P=0.052
P16 IHC and CISH	n = 19 5.3	n = 31 0.0	n = 50 2.0	n = 56 30.4	7.8 (1.0–63.6) P=0.031	27.9 ^{**} (2.5–∞) P<0.001	21.4 (2.8–167.6) P<0.001	62.3 ^d (2.1–>1000) P=0.017

OR₁, Control group 1 vs. Case group; OR₂, Control group 2 vs. Case group; OR_t, Pooled control groups vs. Case group; OR_{tc}, Pooled control groups vs. Case group with logistic regression model controlling for age, sex, smoking*, and alcoholism*.

*Considered negative when not mentioned in patient records.

**Agresti's correction, adding 0.5 to each cell; a: n = 103; b: n = 113; c: n = 113; d: n = 106.

Tumor staging and degree of differentiation did not correlate with HPV positivity with either method ($P>0.20$). Likewise, tumor site within the oropharynx did not correlate with P16 expression ($P=0.60$).

Representative examples of CISH and P16 IHC findings are shown in figures 1 and 2.

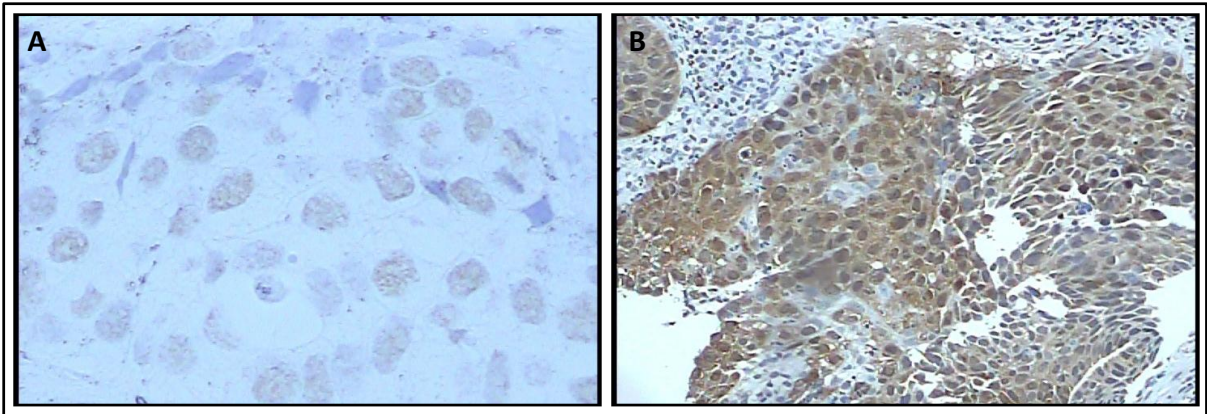


Figure 1. Example of an HPV-positive specimen on CISH (A) and P16 immunohistochemistry (B). **A:** invasive neoplasm with brown-stained granules in the cell nuclei (400x magnification). **B:** invasive neoplasm with marked, diffuse staining of much of the cellular material (100x magnification).

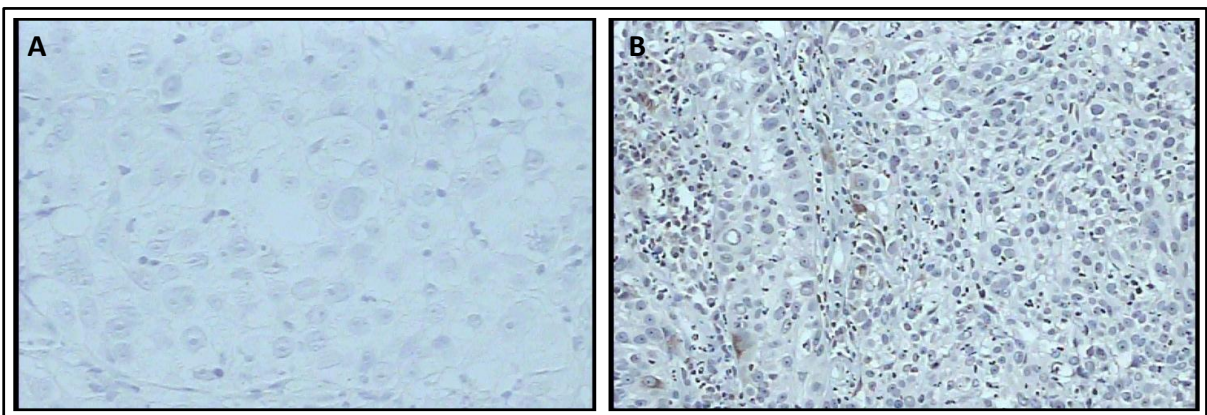


Figure 2. Example of an HPV-negative specimen on CISH (A) and P16 immunohistochemistry (B). **A:** invasive neoplasm with absence of granular nuclear staining (200x magnification). **B:** invasive neoplasm with scant cytoplasmic staining (100x magnification).

Discussion

The incidence of OSCC is on the rise, and HPV infection is now recognized as an independent risk factor for development of this neoplasm^{5,6,13}. Several methods are available for detection of HPV in tumor tissue. In the present study, the CISH and P16 immunohistochemistry techniques were used due to their significance and ample availability.

All analyses were performed in paraffin-embedded archival specimens. Several studies have shown that these samples may provide insufficient DNA quantity and quality for PCR analysis. Therefore, in these cases, CISH appears to yield better results^{35,39}.

Several authors consider P16 to be a surrogate marker of viral activity in the host cell^{19,20,34,39,44}, that is, P16 overexpression occurs when there is active HPV infection, due to inactivation of RB protein by the E7 oncoprotein of HR-HPVs. The RB protein controls cell proliferation and acts as a negative regulator of P16¹⁴⁻²⁰.

The importance of the present study lies in the fact that, to the best of our knowledge, this was the largest Brazilian case series (n=59) to assess HPV in paraffin-embedded archival specimens of oropharyngeal tumors. Other Brazilian investigators have previously assessed p16 expression in head and neck tumors. Silva *et al.*⁴⁹ reported a frequency of 52.4% in OSCCs, whereas Kaminagakura *et al.*⁵⁰ found a 22.2% positivity rate in samples of squamous cell carcinoma of the oral cavity.

In our sample, there was a significant difference in HPV frequency (as assessed by P16 IHC) between the case and control groups ($P < 0.001$), both on separate comparison of control subgroups 1 and 2 and on analysis using both control subgroups as a whole. These findings suggest an active HPV infection in cases of OSCC that did not occur in patients without such tumors.

No significant between-group differences were observed when analysis was conducted using CISH alone. In fact, the frequency of CISH positivity was higher in control group 1 (non-neoplastic lesions of the palatine tonsils) than in the case group. One possible explanation for this finding is that the probe used in our CISH analysis identified both HR-HPVs (16,18,31,33,35) and LR-HPVs (6 and 11), unlike P16 immunohistochemistry, which pinpoints HR-HPV activity exclusively. In other words, HPV-6 and/or HPV-11 may be present in the tonsils of patients with no oropharyngeal neoplasms, and as these HPV subtypes are non-carcinogenic, P16 expression will be negative. CISH does not distinguish between latent HPV infection and active HPV infection, which is comparatively infrequent.

Another interesting finding is that 68.2% of patients in control group 1 were female, versus 6.8% in the case group ($p < 0.001$). Mean age also differed significantly, with younger patients in control group 1. The literature suggests that the prevalence of genital HPV infection increases yearly between the ages of 14 and 24 and declines from the age of 59 onward^{4,15,23}. Unfortunately, no such data on the natural history and progression of oral and oropharyngeal HPV infection are available, but if it is similar to that of genital infection, this would provide an epidemiological rationale for the higher frequency of HPV in control group 1^{4,14,25,30,43}.

A significant difference between groups ($p < 0.001$) was also observed on the classification of samples as HPV-positive or HPV-negative by combined use of P16 IHC and CISH. IHC is known to be a more sensitive method, whereas CISH is more specific^{19,36,37}. Therefore, some authors have proposed a flowchart for HPV identification employing these two methods, but reserving CISH for HR-HPV detection when P16 IHC is positive^{36,39,40}.

The initial objective of the present study was to ascertain the prevalence of both high-risk and low-risk HPV in oropharyngeal tissues. However, over the course of the study, the P16 immunohistochemistry technique also became available. Ideally, testing for carcinogenic HPV subtypes alone by CISH might yield better results.

The prevalence of HPV in the oropharyngeal tissues of patients with no OSCC was 5.3%, as determined by isolated P16 IHC and by CISH + IHC. This value is within the range reported elsewhere in the literature (0–14%)^{24,25,28,30,32}. Differences between studies are attributable to different methods, specimen types, and geographic variability.

The frequency of HPV in OSCCs as detected by combined CISH and IHC was 30.4%. Thavaraj *et al.*⁴⁰ reported an HPV prevalence of 53% with combined HR-HPV ISH and IHC, whereas Lee *et al.*³⁵, who restricted their analysis to tonsillar tumors of patients with no history of smoking or alcoholism, reported a positivity rate of 29%.

Some investigators have noted that P16-positive squamous-cell head and neck cancers are more likely to be poorly differentiated^{43,51}. This finding was not corroborated by the present study.

There is substantial controversy in the literature as to the optimal cutoff point for determination of P16 positivity¹⁹. Some authors suggest high cutoffs are more appropriate, whereas others use lower cutoff points^{37,39}. Fischer *et al.*⁴⁶ identified a 41.17% prevalence rate of HPV in OSCCs as detected by P16 immunohistochemistry, considering any cases with $\geq 5\%$ immunoreactivity in cell nuclei as “positive”. The authors did not take intensity of staining into account.

Jordan *et al.*³⁷ recently reported that a cutoff point of 2+ on a staining intensity scale of 0 to 3+ and a staining percentage of 35% on a scale of 0 to 100% provide good sensitivity and specificity as compared with expression of E6/E7 by HR-HPVs. In the present study, we used a cutoff point of 25%, which yielded P16 positivity in 58.5% of cases, a rate similar to those reported by Silva *et al.*⁴⁹ (52.4%) and Thavaraj *et al.*⁴⁰ (63%). Some authors have found lower positivity rates (Schlecht *et al.*¹⁹ reported 43%), whereas those who focused analysis on tonsillar tumors alone have reported higher rates, such as Heath *et al.*⁴³ (73%) and Jordan *et al.*³⁷ (70.2%).

In the present study, we also conducted a separate statistical analysis with a higher cutoff for the percentage of stained cells ($>50\%$), while keeping the staining intensity cutoff at 2+; this yielded no difference in the degree of statistical significance ($P=0.002$). Specimens that tested negative for HPV probably correspond to cases in which HPV was not involved in the carcinogenesis of OSCC.

The retrospective design of this study entails several limitations in interpretation of its results. One such limitation is the issue of missing data in patient records. However, there were no significant differences in study results when analysis was restricted to patients whose records contained all variables of interest. Another potential source of bias is the difference in age between the case and control groups, which is relevant in view of the differences in HPV prevalence across age groups. Furthermore, control group 1 comprised patients who had undergone surgery

for benign conditions of the palatine tonsils, such as tonsillar hypertrophy or recurrent tonsillitis, which are more common in younger patients.

Nevertheless, even after controlling for such variables as sex, age, and smoking and alcohol intake, significant differences in P16 positivity ($P=0.018$) and CISH + P16 positivity ($P=0.017$) remained between the case and control groups.

In conclusion, the findings presented in our study suggest a higher frequency of HPV infection in patients with OSCC as compared with controls. However, tumor site within the oropharynx, tumor stage, and degree of differentiation did not correlate with HPV positivity. P16 immunohistochemistry alone and combined with CISH were shown to be effective for detection of HPV infection. Further studies are required to elucidate the natural history of oral and oropharyngeal HPV infection and its impact on the pathogenesis of OSCC.

References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013 Jan;63(1):11–30.
2. Danenberg PV, Grimminger CM. Update of prognostic and predictive biomarkers in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011;268:05–16.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. [Acesso em 02 de novembro de 2012]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>
4. Joseph AW, D'Souza G. Epidemiology of human papillomavirus-related head and neck cancer. *Otolaryngol. Clin. North Am*. 2012 Aug;45(4):739–64.
5. Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *Journal of Clinical Pathology*. 2004 May 1;57(5):449–55.

6. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, Finch JL, Robinson LJ, Willson T, et al. Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *Laryngoscope*. 2007 Dec;117(12):2115–28.
7. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J. Clin. Oncol*. 2008 Feb 1;26(4):612–9.
8. Hammarstedt L, Dahlstrand H, Lindquist D, Onelöv L, Ryott M, Luo J, et al. The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing. *Acta Otolaryngol*. 2007 Sep;127(9):988–92.
9. Braakhuis BJM, Visser O, Leemans CR. Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults. *Oral Oncol*. 2009 Sep;45(9):e85–89.
10. Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya KAAS, Ogden G, Macpherson LMD. Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. *Oral Oncol*. 2006 Jul;42(6):586–92.
11. Hocking JS, Stein A, Conway EL, Regan D, Grulich A, Law M, et al. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br. J. Cancer*. 2011 Mar 1;104(5):886–91.
12. Biazevic MGH, Castellanos RA, Antunes JLF, Michel-Crosato E. [Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002]. *Cad Saude Publica*. 2006 Oct;22(10):2105–14.
13. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho C-H, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & Neck Oncology*. 2010;2(1):15.
14. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. 2010 Aug;11(8):781–9.

15. Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol. Oncol.* 2007 Nov;107(2 Suppl 1):S2–5.
16. Langendijk JA, Psyrri A. The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Ann. Oncol.* 2010 Oct;21(10):1931–4.
17. Marklund L, Hammarstedt L. Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol.* 2011;2011:509036.
18. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin. Cancer Res.* 2009 Nov 15;15(22):6758–62.
19. Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Nuovo GJ, Li M, Dunne A, Kawachi N, et al. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod. Pathol.* 2011 Oct;24(10):1295–305.
20. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, Chaturvedi AK, D'Souza G, Gravitt PE, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck.* 2009 Nov;31(11):1393–422.
21. Best SR, Niparko KJ, Pai SI. Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2012 Aug;45(4):807–22.
22. Giuliano AR, Lee J-H, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet.* 2011 Mar 12;377(9769):932–40.
23. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA.* 2007 Feb 28;297(8):813–9.
24. Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy

men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2011 Jan;20(1):172–82.

25. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, Robinson LJ, Willson T. Prevalence of oncogenic human papillomavirus 16 and 18 in the palatine tonsils of the general adult population. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2009 Jun;135(6):554–7.

26. Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis.* 2010 Jun;37(6):386–91.

27. Du J, Nordfors C, Ahrlund-Richter A, Sobkowiak M, Romanitan M, Näsman A, et al. Prevalence of oral human papillomavirus infection among youth, Sweden. *Emerging Infect. Dis.* 2012 Sep;18(9):1468–71.

28. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho M da G da C, Barros FS de. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010 Feb;76(1):78–84.

29. Ribeiro KMX, Alvez JM, Pignatari SSN, Weckx LLM. Detection of human papilloma virus in the tonsils of children undergoing tonsillectomy. *Braz J Infect Dis.* 2006 Jun;10(3):165–8.

30. Do Sacramento PR, Babeto E, Colombo J, Cabral Ruback MJ, Bonilha JL, Fernandes AM, et al. The prevalence of human papillomavirus in the oropharynx in healthy individuals in a Brazilian population. *J. Med. Virol.* 2006 May;78(5):614–8.

31. Baloglu H, Kuçukodaci Z, Gungör A, Haholu A, Cincik H, Yasa Yan G, et al. Human Papilloma Virus Prevalence in Hyperplastic Tonsils and Adenoids in Children and Young Adults. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2010;30(2):528–32

32. Chen R, Sehr P, Waterboer T, Leivo I, Pawlita M, Vaheri A, et al. Presence of DNA of human papillomavirus 16 but no other types in tumor-free tonsillar tissue. *J. Clin. Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1408–10.

33. Jayaprakash V, Reid M, Hatton E, Merzianu M, Rigual N, Marshall J, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncol.* 2011 Nov;47(11):1048–54.

34. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med*. 2010 Jun 10;363(1):24–35.
35. Lee WT, Tubbs RR, Teker AM, Scharpf J, Strome M, Wood B, et al. Use of in situ hybridization to detect human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma patients without a history of alcohol or tobacco use. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 2008 Oct;132(10):1653–6.
36. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-JM, Haesevoets A, Snijders PJF, Pawlita M, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int. J. Cancer*. 2007 Dec 1;121(11):2465–72.
37. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, He X, Pickard R, Koluder M, et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am. J. Surg. Pathol*. 2012 Jul;36(7):945–54.
38. Ma C, Lewis J Jr. Small biopsy specimens reliably indicate p16 expression status of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2012 Jun;6(2):208–15.
39. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*. 2010 May 1;116(9):2166–73.
40. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J. Clin. Pathol*. 2011 Apr;64(4):308–12.
41. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med*. 2007 May 10;356(19):1944–56.
42. Acay R, Rezende N, Fontes A, Aburad A, Nunes F, Sousa S. Human papillomavirus as a risk factor in oral carcinogenesis: a study using in situ

hybridization with signal amplification. *Oral Microbiol. Immunol.* 2008 Aug;23(4):271–4.

43. Heath S, Willis V, Allan K, Purdie K, Harwood C, Shields P, et al. Clinically significant human papilloma virus in squamous cell carcinoma of the head and neck in UK practice. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2012 Feb;24(1):e18–23

44. Cohan DM, Popat S, Kaplan SE, Rigual N, Loree T, Hicks WL Jr. Oropharyngeal cancer: current understanding and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009 Apr;17(2):88–94.

45. Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, Green E, Tornillo L, Lugli A, et al. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann. Oncol.* 2010 Oct;21(10):1961–6.

46. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int. J. Cancer*. 2010 Mar 1;126(5):1256–62.

47. Pharynx. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: *AJCC Cancer Staging Manual*. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 41-56.

48. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D; World Health Organization. *Classification of tumors. Pathology and genetics head and neck*. Lyon: IARC Press, 2005. 430 p.

49. Silva SD, Nonogaki S, Soares FA, Kowalski LP. p16 (INK4a) has clinicopathological and prognostic impact on oropharynx and larynx squamous cell carcinoma. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2012 Dec;45(12):1327–33.

50. Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int. J. Cancer*. 2012 Apr 15;130(8):1726–32.

51. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stutzer H, Preuss SF, Hoffmann TK, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int. J. Cancer*. 2007 Apr 15;120(8):1731–8.

6. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

ASSOCIAÇÃO ENTRE O PAPILOMA VÍRUS HUMANO E O CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE OROFARINGE: UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE

Carla Cuenca Schwartzmann¹, Gerson Schulz Maahs², Pedro Bandeira Aleixo³,
Lúcia Maria Kliemann⁴, Gustavo Cartaxo de Lima Gössling⁵, Daiane Oliveira Braga⁶,
Rosalva Meurer⁷, Gilberto Schwartzmann⁸

- 1- Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da UFRGS e Médica Otorrinolaringologista
- 2- Doutor em Medicina e Ciências da Saúde pela PUCRS e Professor Adjunto do Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia da UFRGS
- 3- Mestre em Patologia e Doutorando em Patologia pela UFCSPA
- 4- Doutora em Medicina: Clínica Médica pela UFRGS e Professora de Patologia da UFRGS
- 5- Acadêmico de Medicina da UFRGS
- 6- Médica Residente do Serviço de Otorrinolaringologia da PUCRS
- 7- Química e Mestre em Patologia pela UFCSPA
- 8- Professor do Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da UFRGS

Resumo

Introdução: A incidência do carcinoma epidermóide de orofaringe (CEO) aumentou em todo o mundo nos últimos 30 anos. Estudos identificaram o papiloma vírus humano (HPV) como um fator de risco para essa neoplasia. **Objetivos:** O objetivo do presente estudo foi verificar a frequência do HPV em pacientes com CEO e em pacientes sem neoplasia maligna e avaliar a existência de uma diferença estatisticamente significativa na frequência do HPV entre os dois grupos. O objetivo secundário foi estudar a correlação entre a infecção pelo HPV e a localização do tumor na orofaringe, o estadiamento clínico e o grau de diferenciação tumoral. **Métodos:** Foi realizado um estudo de caso-controle com 59 pacientes com CEO e 54 pacientes sem neoplasia, no qual foram analisados os blocos de parafina contendo material tumoral e tecido não neoplásico. Foram analisadas respectivamente a frequência do HPV e sua atividade utilizando a técnica de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) para HPV de baixo risco (BR) e alto risco (AR) e a imunistoquímica para P16. **Resultados:** A frequência do HPV foi maior no grupo caso em comparação ao grupo controle quando utilizamos a imunistoquímica para P16 como método de detecção isolado (OR=10,3; P<0,001) e quando utilizamos a CISH e a imunistoquímica para P16 em conjunto (OR=21,4; P<0,001). A CISH isoladamente não mostrou uma diferença estatisticamente significativa na frequência do HPV entre os grupos estudados (P=0,572). A localização tumoral na orofaringe e o estadiamento clínico não mostraram correlação com a positividade para o HPV em nenhum dos métodos utilizados, assim como o grau de diferenciação tumoral (P>0,20). **Conclusão:** Utilizando-se a técnica de imunistoquímica para P16 isolada ou combinada com a técnica de CISH, observou-se uma maior positividade para o HPV no grupo de pacientes com CEO. A localização do tumor na orofaringe, o estadiamento clínico e o grau de diferenciação tumoral não tiveram correlação com a positividade para o HPV.

Palavras chave: carcinoma de células escamosas; hibridização *in situ*; imunistoquímica; orofaringe; papillomavirus humano 16; tonsila palatina

Introdução

O carcinoma epidermóide de orofaringe (CEO) representa 3 a 5% de todas as neoplasias malignas no mundo ocidental^{1,2}. Em 2008 ocorreram 13.735 novos casos de câncer de cavidade oral e faringe no Brasil e 7.354 óbitos³. Para o ano de 2013, a Sociedade Americana de Câncer estima uma ocorrência de 41.380 novos casos de câncer de cavidade oral e faringe e 7.890 mortes nos EUA¹.

Nos últimos 30 anos, a incidência do CEO aumentou em todo o mundo, apesar da diminuição na incidência dos outros tumores malignos de cabeça e pescoço⁴⁻¹². Nos últimos anos, o tabagismo, principal fator de risco para o CEO, diminuiu consideravelmente em muitos países desenvolvidos e em desenvolvimento, o que sugere a influência de outros fatores na carcinogênese do CEO¹¹.

Neste sentido, estudos recentes têm demonstrado que o HPV é um fator de risco para o CEO, independente dos demais fatores já conhecidos, como o tabagismo e o etilismo. O CEO associado ao HPV apresenta características moleculares, epidemiológicas e clínicas distintas do CEO não relacionado ao HPV^{5,6,13}.

Os casos positivos para o HPV acometem geralmente pacientes mais jovens e apresentam uma melhor sobrevida livre de doença e sobrevida global^{5-7,13,14}. Os CEO relacionados ao HPV apresentam a expressão das oncoproteínas E6 e E7. A proteína E7 inativa a proteína supressora tumoral RB (retinoblastoma). Essa proteína age como um regulador negativo da expressão da proteína P16 – proteína supressora tumoral codificada pelo gene *CDKN2A*. Conseqüentemente, os tumores HPV positivos apresentam uma superexpressão da P16, diferentemente dos casos negativos para o HPV¹⁴⁻²⁰.

Sabe-se que a infecção pelo HPV na região anogenital é comum na população mundial, mas na grande maioria dos casos apresenta um curso autolimitado, com resolução de aproximadamente 90% em até 2 anos^{15,21-23}. Com relação à prevalência da infecção pelo HPV na mucosa oral e da orofaringe em indivíduos saudáveis, os resultados são ainda inconclusivos^{14,24-32}. Da mesma forma,

estudos que analisaram a associação entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento do CEO também apresentam resultados conflitantes, com prevalências do HPV em tumores de cabeça e pescoço que variam entre 10 a 78%^{7,13,33-41}.

Essa variabilidade nos resultados parece decorrer, ao menos em parte, do uso de distintos métodos para a detecção do HPV e das características da amostra analisada^{14,24,36,39}. Outro fator que contribui para a variabilidade dos achados de prevalência é a ausência de uma padronização dos sítios anatômicos estudados em cada pesquisa. Em alguns estudos, a prevalência é calculada com base em dados gerais para tumores epidermóides da região de cabeça e pescoço^{13,20,39}. Em outros, os tumores de orofaringe e de boca são agrupados como pertencentes a um mesmo sítio, ainda que haja dados sugestivos de que o CEO apresenta uma maior prevalência do HPV em comparação à boca e à laringe^{42,43}.

A maior frequência do HPV no CEO provavelmente decorre da justaposição entre o epitélio escamoso celular e o tecido linfóide e da mucosa não queratinizada que facilitaria o acesso do vírus à camada basal. Esta justaposição assemelha-se à junção escamocolunar do colo uterino, onde há uma elevada prevalência de câncer associado ao HPV³⁰.

Apesar dos grandes avanços neste tema, não existe na literatura nenhum teste padronizado, validado e universalmente aceito para determinar o status do HPV^{14,19,25,35,37,42,44}. Os métodos mais comumente utilizados são a reação em cadeia da polimerase (PCR), a hibridização *in situ* (HIS) e a imunoistoquímica para P16^{14,19}.

Considerando que o conhecimento sobre a história natural das neoplasias da orofaringe induzida pelo HPV é ainda limitado e que o status do HPV no tumor parece impactar na história natural da doença e na resposta ao tratamento, torna-se imperioso que novos estudos sobre a prevalência do HPV sejam realizados^{4,14,16,25,30,43}. Recentemente, estudos clínicos identificaram fortes evidências de que o status tumoral do HPV é um fator prognóstico independente em pacientes com CEO^{34,45,46}. A obtenção de um maior número de informações

científicas sobre o tema pode ter grande importância no estabelecimento de programas de prevenção e detecção precoce do CEO no futuro²⁵.

Neste contexto, o objetivo do presente estudo é determinar a frequência da infecção pelo HPV em pacientes portadores de CEO e em pacientes sem neoplasia em um hospital universitário na Região Sul do Brasil, analisando dois métodos distintos e disponíveis para sua detecção. Secundariamente, será avaliada a relação do status do HPV no tumor com o sítio primário da lesão, o estadiamento clínico e o grau de diferenciação tumoral.

Materiais e métodos

Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo de caso-controle.

População estudada

Foram incluídos no estudo pacientes com idade superior a 18 anos, submetidos a procedimentos cirúrgicos no período entre janeiro de 2007 e janeiro de 2012, no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Para a inclusão dos pacientes, foi realizada uma busca no banco de dados do Serviço de Patologia da mesma instituição, tendo como referência o resultado do exame anatomopatológico (por exemplo: carcinoma) ou a localização anatômica da doença (por exemplo: orofaringe).

A amostra incluiu pacientes que já haviam sido submetidos a algum procedimento cirúrgico como parte de seu tratamento. Foram estudados três grupos de pacientes: um “grupo caso”, incluindo pacientes com CEO e dois “grupos controle”, um deles (grupo controle 1) com pacientes portadores de doenças benignas da orofaringe (por exemplo: hipertrofia de tonsilas palatinas e tonsilites de

repetição) e o segundo (grupo controle 2) com pacientes portadores de lesões benignas da cavidade oral.

Foram avaliados as variáveis sexo, idade e fatores de risco (tabagismo e etilismo), bem como o sítio primário da lesão, o estadiamento clínico dos pacientes (segundo o *American Joint Committee on Cancer*⁴⁷) e o grau de diferenciação do tumor (segundo a Organização Mundial de Saúde⁴⁸): bem, moderadamente e pouco diferenciado. Todas essas variáveis foram obtidas do prontuário eletrônico do paciente.

Após a identificação dos pacientes, as lâminas de hematoxilina e eosina (HE) foram revisadas por um patologista (LMK) para a confirmação do diagnóstico histológico, com posterior separação do bloco de parafina contendo a amostra de tecido de cada paciente para a realização da HIS e da imunoistoquímica para P16. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (número do projeto: 120376).

Hibridização *in situ* para o vírus do Papiloma Humano

A HIS foi realizada pela técnica de hibridização *in situ* cromogênica (CISH). Cortes do material emblocado com espessura de 3 micrômetros foram montados em lâminas silanizadas. As lâminas foram secadas em estufa a 70°C por 10 minutos e depois foram desparafinadas em xilol durante 5 minutos por duas vezes e em etanol 100% durante 3 minutos por três vezes. Em seguida, as lâminas foram tratadas com água oxigenada 3% por 10 minutos e depois lavadas em água destilada.

A proteólise foi realizada por digestão enzimática com pepsina em câmara úmida em estufa incubadora a 37°C por 3 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram colocadas em solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) previamente aquecida a 95°C em banho-maria num recipiente fechado por 15 minutos. As lâminas foram novamente lavadas em água destilada e o excesso foi secado.

Em temperatura ambiente e após agitação em vortex, 10µL da mistura de sondas prontas para uso *ZytoFast*® HPV Screening Probe (Digoxigenin-labeled) (catálogo T-1144-400 Zytovision, Alemanha) para a detecção de DNA de HPV tipos 6/11/16/18/31/33/35 foi aplicada no centro da lâmina. Para evitar bolhas, foi colocada uma lamínula de 22 x 22 mm e selado com cola na periferia. As lâminas seguiram para desnaturação em placa aquecida a 75°C por 5 minutos e depois foram transferidas para a câmara úmida para hibridizar em estufa incubadora a 37°C durante a noite. No dia seguinte, após a retirada do selante e da remoção da lamínula, seguiu-se a lavagem das lâminas em tampão *tris-buffered saline* (TBS) pré aquecido a 55°C por 5 minutos e temperatura ambiente por 5 minutos.

Para a revelação da reação de hibridização foi utilizado o kit de detecção *ZytoFast* PLUS CISH Polymer Detection Kit HRP-DAB (catálogo T-1068-40 Zytovision, Alemanha) para a visualização das sondas marcadas com digoxigenina conforme instruções do fabricante. O revelador do sinal foi o 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e a contra-coloração foi realizada com *nuclear blue solution* (*ZytoFast* PLUS CISH Polymer Detection Kit HRP-DAB Zytovision, Alemanha) por 3 minutos. As lâminas foram desidratadas em etanol durante 2 minutos por quatro vezes e em xilol durante 2 minutos por duas vezes. Após a secagem a temperatura ambiente, as lâminas foram montadas com bálsamo e a avaliação do resultado foi visualizado em microscópio óptico (Olympus BX41) em menor (40x) e em maior aumento (400x). Controles positivo e negativo foram incluídos em cada rodada de reação.

O caso foi considerado positivo para a presença do DNA viral de HPV quando se observou qualquer intensidade de sinal de coloração marrom granular no núcleo das células. As lâminas foram avaliadas por dois observadores de forma independente: um médico patologista com experiência na técnica (PBA) e um técnico de nível superior treinado (RM). Casos discordantes foram discutidos posteriormente em conjunto.

Imunoistoquímica para P16

O teste de imunistoquímica para a detecção da expressão de P16 foi realizado pela técnica estreptavidina-biotina peroxidase (LSAB-HRP). Cortes do material embocado em parafina com espessura de 3 micrômetros foram montados em lâminas silanizadas. As lâminas foram desparafinadas em banhos de xilol e reidratadas em álcool. A seguir foi realizada a recuperação antigênica pela incubação em tampão citrato pH 6 em banho-maria e após tratamento com peróxido de hidrogênio a 5% em metano para o bloqueio da peroxidase endógena.

Antes da reação com o anticorpo primário, uma etapa de bloqueio de proteínas inespecíficas foi realizada com leite em pó desnatado diluído a 5% em PBS (tampão fosfato-salino) por 20 minutos. O anticorpo primário monoclonal anti-p16 de camundongo clone F12 (catálogo SC1661 Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) foi diluído (1:200) em tampão PBS e incubado em geladeira *overnight*. Para a revelação, foi utilizado um kit de revelação de anticorpos secundários e reagentes LSAB+/HRP (Dako) conforme instruções. A coloração cromogênica foi realizada com DAB e contra coloração com hematoxilina.

As reações foram acompanhadas de controles positivos e negativos. Os controles positivos e negativos foram obtidos em material de colo uterino com severa displasia, com e sem o anticorpo primário respectivamente. O produto final da reação, um precipitado castanho escuro no citoplasma e/ou no núcleo das células, foi observado ao microscópio óptico Olympus CX31 em menor (40x) e em maior aumento (400x). Os casos foram avaliados sempre nas áreas epiteliais, incluindo neoplasia invasora, epitélio displásico e epitélio não displásico, sendo classificados quanto à intensidade, ao padrão e à localização celular predominante de marcação.

A intensidade de marcação foi classificada como ausente (0+), fraca (1+), moderada (2+) ou forte (3+), sempre prevalecendo a maior intensidade. O padrão de marcação foi classificado como (A)- quando nenhuma célula foi corada; (B)- quando 1% a 25% das células foram coradas; (C)- quando 26% a 50% das células foram coradas; (D) -quando 51% a 75% das células foram coradas e (E)- quando 76% a 100% das células foram coradas. A localização celular de marcação predominante foi classificada como (a)- nuclear, (b)- citoplasmática e (c)- citoplasmática e nuclear. O caso foi considerado positivo para P16 quando a marcação citoplasmática e/ou

nuclear foi de intensidade moderada (2+) em no mínimo 26% das células. A maior intensidade de marcação presente na peça avaliada foi considerada. As lâminas foram avaliadas por dois médicos patologistas (PBA e LMK) com experiência em imunohistoquímica de forma independente. Casos discordantes foram analisados posteriormente.

Análise estatística

O tamanho da amostra foi calculado utilizando uma comparação de duas amostras de proporções estimadas. Baseado em estudos anteriores, nós estimamos a proporção do grupo controle em 5% e do grupo caso em 25%. Segundo o programa *Programs for Epidemiologists (Pepi)* versão 4.0, utilizando um poder de 0,80 e um nível de significância de 0,05, foi sugerida uma amostra de 59 pacientes em cada grupo. Estimando eventuais perdas, elevamos em 20% o tamanho da amostra em cada grupo.

Os dados quantitativos foram descritos por média e desvio-padrão. As informações categóricas foram apresentadas por contagens e percentuais. Para a comparação dos dados quantitativos utilizamos a *analysis of variance* (ANOVA) ou o teste t Student segundo o número de grupos envolvidos. Para a comparação de dados categóricos utilizamos o teste exato de Fisher seguido do cálculo do *odds ratio* (OR) como medida de força de associação com seu respectivo intervalo de confiança de 95%. Na impossibilidade de obter o OR por frequência zero, utilizamos a correção de Agresti, a qual preconiza adicionar 0,5 a cada casela. O OR foi ajustado para fatores de confusão utilizando-se um modelo de regressão logística múltipla incluindo os fatores sexo, idade, tabagismo e etilismo. O nível de significância adotado foi de $\alpha=0,05$. Os dados foram analisados com o programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS) versão 18.0.

Resultados

Dos 140 pacientes selecionados para o estudo, 15 tinham idade menor que 18 anos. Em 2 casos o número do registro do paciente não correspondeu à lâmina de HE nem ao bloco de parafina e 10 blocos de parafina não foram encontrados na blocoteca do serviço de patologia. Todos esses casos foram excluídos do estudo, totalizando 27 perdas.

Entre os 113 pacientes estudados, 40 eram do sexo feminino e 73 do sexo masculino. A idade variou entre 19 e 81 anos. Dos pacientes em que os fatores de risco tabagismo e etilismo foram mencionados em prontuário (97 e 92 pacientes respectivamente), 68% eram tabagistas e 51% eram etilistas. Estes resultados estão representados na tabela 1.

Tabela 1 – Características dos pacientes dos grupos controle (1 e 2) e caso.

	Controle		Caso n = 59	P
	Grupo 1 n = 22	Grupo 2 n = 32		
Idade, anos	35,9±14,4	49,8±14,1	58,1±9,2	<0,001
Sexo feminino, n ^o (%)	15 (68,2)	21 (65,6)	4 (6,8)	<0,001
Tabagismo, n ^o (%)	n = 15 3 (20,0)	n = 28 11 (39,3)	n = 54 52 (96,3)	<0,001
Etilismo, n ^o (%)	n = 15 0 (0,0)	n = 25 4 (16,0)	n = 52 43 (82,7)	<0,001

Os dados são apresentados como média±desvio-padrão e contagem (percentual).

Com relação ao grupo caso, a localização mais comum do tumor na orofaringe foi na tonsila palatina (49,2%) seguido pela base de língua (28,8%). O estadiamento clínico do paciente foi mencionado em 36 prontuários dos 59 analisados e 64,9% dos pacientes foram classificados como estágio IV. O grau de diferenciação tumoral foi mencionado em 56 prontuários e 78,6% dos tumores eram moderadamente diferenciados. Estes resultados estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Características dos tumores dos pacientes do grupo caso

Característica	Estatística
<u>Localização</u>	<u>n = 59</u>
Tonsila palatina	29 (49,2)
Base de língua	17 (28,8)
Palato mole	11 (18,6)
Parede posterior	2 (3,4)
<u>Estádio</u>	<u>n = 36</u>
I	5 (13,9)
II	1 (2,8)
III	5 (13,9)
IV	25 (64,9)
<u>Grau de diferenciação</u>	<u>n = 56</u>
Bem diferenciado	2 (3,6)
Moderadamente diferenciado	44 (78,6)
Pouco diferenciado	10 (17,9)

Os dados são apresentados como contagem (percentual).

A CISH foi realizada na totalidade dos pacientes (113 blocos de parafina). Entretanto, em 10 amostras dos blocos de parafina o material foi insuficiente para a análise imunistoquímica. Conseqüentemente, esse teste foi realizado em 103 pacientes.

Na tabela 3, estão representados a frequência do HPV nos pacientes com CEO e sem neoplasia pela análise da imunoistoquímica para P16, da CISH e pelos dois métodos em conjunto e o valor do OR com seus respectivos intervalos de confiança.

Tabela 3 – Positividade para o HPV nos grupos controle (1 e 2) e caso, segundo diferentes métodos de detecção, com *odds ratios* brutos e ajustados.

	Controles			Casos	Análise Univariada			Análise Multivariável
	Grupo 1	Grupo 2	Total		OR ₁	OR ₂	OR _t	OR _{tc}
P16	n = 19 5,3	n = 31 16,1	n = 50 12,0	n = 53 58,5	25,4 (3,1 a 204,3) P<0,001	7,3 (2,4 a 22,1) P<0,001	10,3 (3,8 a 28,5) P<0,001	7,5 ^a (1,4 a 40,4) P=0,018
CISH	n = 22 63,6	n = 32 28,1	n = 54 42,6	n = 59 49,2	0,55 (0,22 a 1,51) P=0,319	2,5 (1,0 a 6,2) P=0,075	1,3 (0,6 a 2,7) P=0,572	3,7 ^b (0,8 a 17,1) P=0,091
P16 ou CISH	n = 22 63,6	n = 32 43,8	n = 54 51,9	n = 59 72,9	1,5 (0,5 a 4,4) P=0,426	3,5 (1,4 a 8,5) P=0,012	2,5 (1,1 a 5,5) P=0,032	4,4 ^c (1,0 a 19,9) P=0,052
P16 e CISH	n = 19 5,3	n = 31 0,0	n = 50 2,0	n = 56 30,4	7,8 (1,0 a 63,6) P=0,031	27,9 ^{**} (2,5 a ∞) P<0,001	21,4 (2,8 a 167,6) P<0,001	62,3 ^d (2,1 a >1000) P=0,017

OR₁: Controle Grupo 1 x Casos, OR₂: Controle Grupo 2 x Casos; OR_t: Controle Total x Casos; OR_{tc}: Controle Total x Casos obtido em modelo de regressão logística ajustando para os fatores idade, sexo, tabagismo* e etilismo*; *: Considerado negativo quando não mencionado em prontuário; **: Correção de Agresti adicionando 0,5 a cada casela; a: n = 103; b: n = 113; c: n = 113; d: n = 106.

O estágio clínico, bem como o grau de diferenciação tumoral ($P > 0,20$), não mostrou correlação com a positividade para o HPV em nenhum dos métodos utilizados. Da mesma forma, não houve correlação da localização do tumor na orofaringe com a expressão da P16 ($P = 0,60$).

Como ilustração, as técnicas de CISH e imunistoquímica para P16 estão abaixo representadas nas figuras 1 e 2.

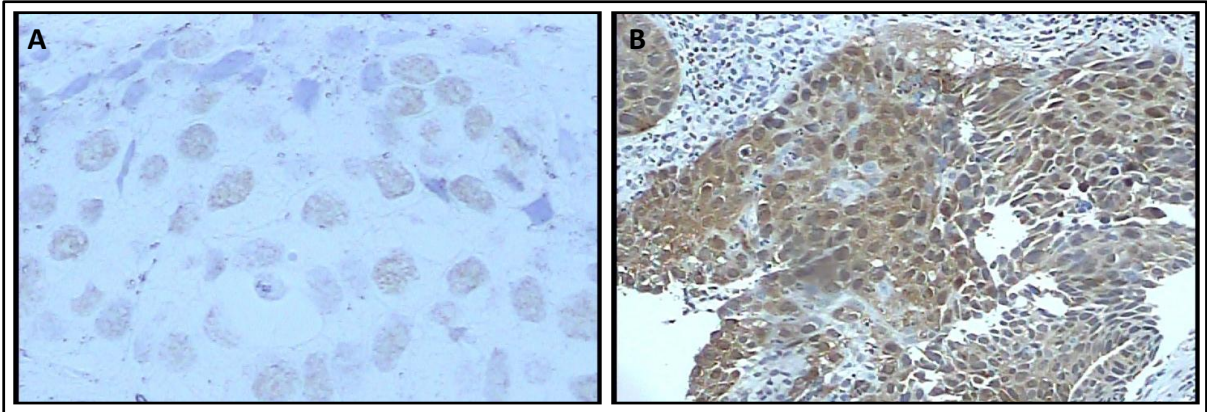


Figura 1. Exemplo de um caso positivo para a CISH (A) e para a imunoistoquímica para P16 (B). **A:** neoplasia invasora com sinal de coloração marrom granular no núcleo das células (400X). **B:** neoplasia invasora com marcação difusa forte em grande parte das células (100X).

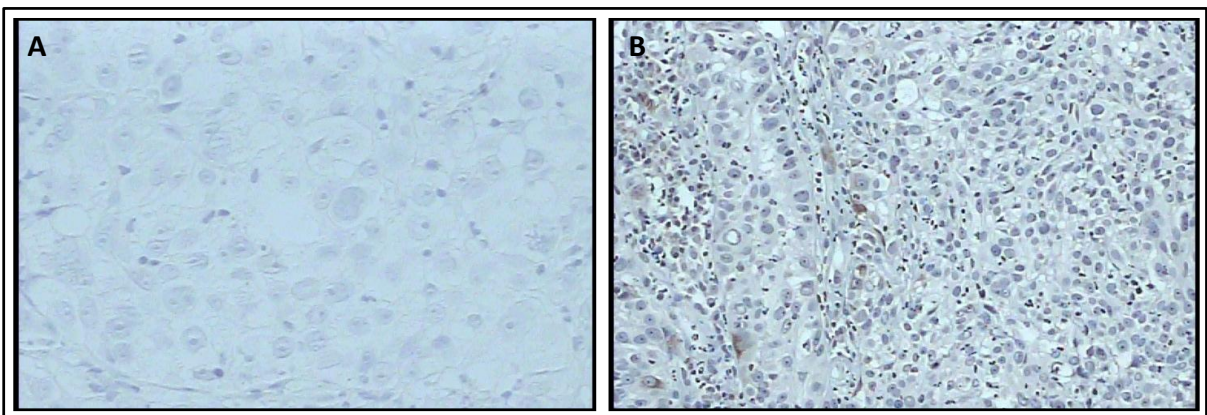


Figura 2. Exemplo de um caso negativo para a CISH (A) e para a imunoistoquímica para P16 (B). **A:** neoplasia invasora – ausência de sinal de coloração marrom granular no núcleo das células (200X). **B:** neoplasia invasora com raras células marcadas no citoplasma (100X).

Discussão

O CEO é uma neoplasia de incidência crescente e a infecção pelo HPV é hoje reconhecida como um fator de risco independente para o seu desenvolvimento^{5,6,13}. Existem diversos métodos de detecção do HPV no tumor. Neste estudo, por sua

maior importância e disponibilidade em nosso meio, as técnicas da CISH e imunohistoquímica para P16 foram utilizadas.

A análise das amostras foi realizada em material arquivado em bloco de parafina. Diversos estudos comprovaram que esse tipo de amostra pode fornecer uma quantidade e uma qualidade insuficiente de DNA para a realização da técnica de PCR. Nesses casos, portanto, a CISH parece oferecer melhores resultados^{35,39}.

A P16 está sendo considerada por diversos autores como um marcador substituto da atividade viral na célula do hospedeiro^{19,20,34,39,44}, ou seja, a superexpressão da P16 ocorre quando o vírus está ativo. A P16 está elevada devido à inativação da proteína RB pela proteína E7 dos HPVs - AR. A proteína RB controla a proliferação celular e atua como um regulador negativo da P16¹⁴⁻²⁰.

A importância do presente estudo é que até o momento, pelo nosso conhecimento, o nosso trabalho apresenta a maior casuística brasileira (n=59) entre as publicações indexadas que avaliaram o HPV em tumores de orofaringe utilizando como amostra material histológico (bloco de parafina). Outros pesquisadores brasileiros também estudaram a expressão de P16 entre os tumores de cabeça e pescoço. Silva *et al.*⁴⁹ verificaram uma frequência de 52,4% entre os CEO, enquanto Kaminagakura *et al.*⁵⁰ encontraram uma positividade de 22,2% ao estudarem somente o carcinoma epidermóide oral.

No nosso estudo encontramos uma diferença estatisticamente significativa na frequência do HPV pela detecção da P16 entre o grupo caso e o grupo controle (P<0,001), tanto na comparação individual dos subgrupos 1 e 2, quanto em relação ao conjunto do grupo. Esses dados sugerem que o vírus está em atividade nos casos de CEO, diferentemente dos casos sem neoplasia.

Com relação à CISH, os resultados encontrados não apresentaram uma diferença estatisticamente significativa. Verificamos, inclusive, que a frequência da CISH entre o grupo controle 1 (tonsila palatina sem neoplasia) foi maior do que no grupo caso. Uma possível explicação é que a sonda utilizada no nosso estudo identifica tanto os HPVs - AR (16,18,31,33,35) como os HPVs - BR (6 e 11), ao

contrário da imunistoquímica para P16, que identifica somente a atividade dos HPVs - AR. Então, a tonsila palatina dos pacientes sem neoplasia pode apresentar o HPV 6 e/ou 11 e, como esses subtipos não são carcinogênicos, a expressão da P16 foi negativa. A CISH não possibilita diferenciar uma infecção transitória do HPV, que ocorre na maioria dos casos, dos casos em que o vírus está em atividade nas células, o que é bem menos frequente.

Outro dado interessante é que no grupo controle 1, 68,2% dos pacientes eram do sexo feminino, contra 6,8% no grupo caso ($p < 0,001$). A idade média também apresentou uma diferença estatisticamente significativa, com o grupo controle 1 apresentando pacientes mais jovens. Dados da literatura sugerem que a infecção genital pelo HPV apresenta um aumento de prevalência a cada ano entre os 14 e 24 anos e que essa taxa declina a partir dos 59 anos^{4,15,23}. Infelizmente não dispomos de dados ainda sobre a história natural da infecção oral e orofaríngea do HPV e sua progressão, mas se considerarmos a história natural da infecção genital, poderíamos justificar por dados epidemiológicos a maior frequência do HPV no grupo controle 1 no nosso estudo^{4,14,25,30,43}.

Deve-se salientar que, ao classificarem-se os pacientes como HPV positivo ou negativo utilizando os dois testes em conjunto (imunistoquímica para P16 e CISH), foi também identificada uma diferença significativa entre os grupos ($p < 0,001$). Sabe-se que a imunistoquímica para P16 apresenta uma maior sensibilidade, enquanto a CISH apresenta uma maior especificidade^{19,36,37}. Por isso, alguns autores justificam a realização de um fluxograma para a identificação do HPV utilizando esses dois métodos, mas com a CISH pesquisando somente os HPVs – AR quando a P16 for positiva^{36,39,40}.

O objetivo inicial desse estudo foi identificar a prevalência do HPV na orofaringe, tanto de alto como de baixo risco. Entretanto, ao longo da pesquisa, foi possível realizar também a técnica de imunistoquímica para P16. Idealmente, a testagem somente de subtipos de HPV carcinogênicos pela técnica da CISH poderia trazer um melhor resultado.

Com relação à frequência do HPV na orofaringe de pacientes sem neoplasia, encontramos uma prevalência de 5,3% utilizando como método a expressão da P16 isolada e em conjunto com a CISH. Esse valor assemelha-se ao encontrado na literatura (0 a 14%)^{24,25,28,30,32}. As eventuais diferenças podem ser atribuídas a distintas metodologias, material analisado e variações geográficas.

A frequência do HPV no CEO utilizando a CISH e a imunistoquímica foi de 30,4%. Thavaraj *et al.*⁴⁰ encontraram uma prevalência de 53% com a HIS para HPV – AR e a imunistoquímica enquanto Lee *et al.*³⁵, analisando somente os tumores de tonsila de pacientes não tabagistas e não etilistas, encontraram 29% de positividade.

Alguns autores identificaram que os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço positivos para P16 são mais propensos a serem tumores do tipo pouco diferenciado^{43,51}. Entretanto, esse dado não se confirmou no presente estudo.

Existe muita controvérsia na literatura com relação ao ponto de corte para determinar a positividade da P16¹⁹. Alguns autores sugerem um ponto de corte elevado, enquanto outros utilizam pontos de corte inferiores^{37,39}. Fischer *et al.*⁴⁶ identificaram uma prevalência de 41,17% do HPV nos CEO quando detectados pela imunistoquímica para P16, considerando como positivos os casos que apresentavam 5% ou mais dos núcleos das células tumorais reativos. Os autores não utilizaram como critério a intensidade da marcação.

Jordan *et al.*³⁷ recentemente determinaram que um ponto de corte de 2+ em uma escala de 0 a 3+ de intensidade de marcação e uma porcentagem de marcação de 35% em uma escala de 0 a 100% oferece uma boa sensibilidade e especificidade quando comparado à expressão das proteínas E6/E7 dos HPVs - AR. No presente estudo, ao utilizarmos um ponto de corte de 25%, encontramos uma positividade para P16 em 58,5% dos casos, valor semelhante ao detectado por Silva *et al.*⁴⁹, de 52,4%, e Thavaraj *et al.*⁴⁰, de 63%. Alguns autores identificaram uma positividade menor, de 43% (Schlecht *et al.*¹⁹), enquanto outros, que estudaram somente os tumores de tonsila, apresentaram valores mais elevados, como Heath *et al.*⁴³, de 73% e Jordan *et al.*³⁷, de 70,2%.

Em nosso estudo, também realizamos uma análise estatística com um ponto de corte maior na porcentagem das células marcadas (>50%) sem modificar a intensidade de 2+ e encontramos que o grau de significância estatística não se modificou ($P=0,002$). As amostras tumorais em que a expressão da P16 foi negativa provavelmente são os casos em que o HPV não está envolvido na carcinogênese.

Tratando-se de um estudo retrospectivo, há várias potenciais limitações na avaliação de nossos resultados. A ausência de alguns dados no prontuário é um exemplo. Entretanto, ao avaliarmos somente os casos em que as variáveis foram todas encontradas em prontuário, não houve diferença na significância estatística. Outro potencial viés em nosso estudo decorre do fato de que os grupos não foram comparáveis em relação à idade, o que nesse caso é importante pelas diferenças na prevalência de infecção pelo HPV nas distintas faixas etárias. Além disso, o grupo controle 1 foi de pacientes submetidos à cirurgia por doenças benignas da tonsila, como hipertrofia ou tonsilites de repetição e estas doenças são mais frequentes em pacientes mais jovens.

Entretanto, mesmo após os dados terem sido ajustados para variáveis como sexo, idade, tabagismo e etilismo, foi encontrada uma diferença significativa ($P=0,018$) na positividade para P16 entre os grupos caso e controle, como também quando utilizados ambos os testes em conjunto ($P=0,017$).

Em conclusão, utilizando a técnica de imunoistoquímica para P16 isolada ou combinada com a técnica de CISH, observamos uma maior positividade para o HPV no grupo de pacientes com CEO, comparativamente aos pacientes sem neoplasia, sugerindo a presença de uma associação entre a infecção pelo HPV e a ocorrência deste tipo de neoplasia. A localização do tumor na orofaringe, o estadiamento clínico e o grau de diferenciação tumoral não tiveram correlação com a positividade para o HPV. Frente a esses achados, novas investigações são necessárias para determinar a história natural da infecção oral e orofaríngea do HPV e o seu impacto na gênese do carcinoma epidermóide.

Referências

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin.* 2013 Jan;63(1):11–30.
2. Danenberg PV, Grimminger CM. Update of prognostic and predictive biomarkers in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a review. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268:05–16.
3. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No.10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. [Acesso em 02 de novembro de 2012]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>
4. Joseph AW, D'Souza G. Epidemiology of human papillomavirus-related head and neck cancer. *Otolaryngol. Clin. North Am.* 2012 Aug;45(4):739–64.
5. Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *Journal of Clinical Pathology.* 2004 May 1;57(5):449–55.
6. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, Finch JL, Robinson LJ, Willson T, et al. Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *Laryngoscope.* 2007 Dec;117(12):2115–28.
7. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J. Clin. Oncol.* 2008 Feb 1;26(4):612–9.
8. Hammarstedt L, Dahlstrand H, Lindquist D, Onelöv L, Ryott M, Luo J, et al. The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing. *Acta Otolaryngol.* 2007 Sep;127(9):988–92.
9. Braakhuis BJM, Visser O, Leemans CR. Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults. *Oral Oncol.* 2009 Sep;45(9):e85–89.
10. Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya KAAS, Ogden G, Macpherson LMD. Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. *Oral Oncol.* 2006 Jul;42(6):586–92.

11. Hocking JS, Stein A, Conway EL, Regan D, Grulich A, Law M, et al. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br. J. Cancer.* 2011 Mar 1;104(5):886–91.
12. Biazevic MGH, Castellanos RA, Antunes JLF, Michel-Crosato E. [Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002]. *Cad Saude Publica.* 2006 Oct;22(10):2105–14.
13. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho C-H, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head & Neck Oncology.* 2010;2(1):15.
14. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010 Aug;11(8):781–9.
15. Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecol. Oncol.* 2007 Nov;107(2 Suppl 1):S2–5.
16. Langendijk JA, Psyrri A. The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Ann. Oncol.* 2010 Oct;21(10):1931–4.
17. Marklund L, Hammarstedt L. Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol.* 2011;2011:509036.
18. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin. Cancer Res.* 2009 Nov 15;15(22):6758–62.
19. Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Nuovo GJ, Li M, Dunne A, Kawachi N, et al. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod. Pathol.* 2011 Oct;24(10):1295–305.
20. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, Chaturvedi AK, D'Souza G, Gravitt PE, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a

National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck*. 2009 Nov;31(11):1393–422.

21. Best SR, Niparko KJ, Pai SI. Biology of human papillomavirus infection and immune therapy for HPV-related head and neck cancers. *Otolaryngol. Clin. North Am*. 2012 Aug;45(4):807–22.

22. Giuliano AR, Lee J-H, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, et al. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet*. 2011 Mar 12;377(9769):932–40.

23. Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, McQuillan G, Swan DC, Patel SS, et al. Prevalence of HPV infection among females in the United States. *JAMA*. 2007 Feb 28;297(8):813–9.

24. Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev*. 2011 Jan;20(1):172–82.

25. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, Robinson LJ, Willson T. Prevalence of oncogenic human papillomavirus 16 and 18 in the palatine tonsils of the general adult population. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. 2009 Jun;135(6):554–7.

26. Kreimer AR, Bhatia RK, Messegue AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sex Transm Dis*. 2010 Jun;37(6):386–91.

27. Du J, Nordfors C, Ahrlund-Richter A, Sobkowiak M, Romanitan M, Näsman A, et al. Prevalence of oral human papillomavirus infection among youth, Sweden. *Emerging Infect. Dis*. 2012 Sep;18(9):1468–71.

28. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho M da G da C, Barros FS de. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010 Feb;76(1):78–84.

29. Ribeiro KMX, Alvez JM, Pignatari SSN, Weckx LLM. Detection of human papilloma virus in the tonsils of children undergoing tonsillectomy. *Braz J Infect Dis*.

2006 Jun;10(3):165–8.

30. Do Sacramento PR, Babeto E, Colombo J, Cabral Ruback MJ, Bonilha JL, Fernandes AM, et al. The prevalence of human papillomavirus in the oropharynx in healthy individuals in a Brazilian population. *J. Med. Virol.* 2006 May;78(5):614–8.

31. Baloglu H, Kuçukodaci Z, Gungör A, Haholu A, Cincik H, Yasa Yan G, et al. Human Papilloma Virus Prevalence in Hyperplastic Tonsils and Adenoids in Children and Young Adults. *Turkiye Klinikleri J Med Sci.* 2010;30(2):528–32

32. Chen R, Sehr P, Waterboer T, Leivo I, Pawlita M, Vaheeri A, et al. Presence of DNA of human papillomavirus 16 but no other types in tumor-free tonsillar tissue. *J. Clin. Microbiol.* 2005 Mar;43(3):1408–10.

33. Jayaprakash V, Reid M, Hatton E, Merzianu M, Rigual N, Marshall J, et al. Human papillomavirus types 16 and 18 in epithelial dysplasia of oral cavity and oropharynx: a meta-analysis, 1985-2010. *Oral Oncol.* 2011 Nov;47(11):1048–54.

34. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med.* 2010 Jun 10;363(1):24–35.

35. Lee WT, Tubbs RR, Teker AM, Scharpf J, Strome M, Wood B, et al. Use of in situ hybridization to detect human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma patients without a history of alcohol or tobacco use. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2008 Oct;132(10):1653–6.

36. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel E-JM, Haesevoets A, Snijders PJF, Pawlita M, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int. J. Cancer.* 2007 Dec 1;121(11):2465–72.

37. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, He X, Pickard R, Koluder M, et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am. J. Surg. Pathol.* 2012 Jul;36(7):945–54.

38. Ma C, Lewis J Jr. Small biopsy specimens reliably indicate p16 expression status

of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2012 Jun;6(2):208–15.

39. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer.* 2010 May 1;116(9):2166–73.

40. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J. Clin. Pathol.* 2011 Apr;64(4):308–12.

41. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2007 May 10;356(19):1944–56.

42. Acay R, Rezende N, Fontes A, Aburad A, Nunes F, Sousa S. Human papillomavirus as a risk factor in oral carcinogenesis: a study using in situ hybridization with signal amplification. *Oral Microbiol. Immunol.* 2008 Aug;23(4):271–4.

43. Heath S, Willis V, Allan K, Purdie K, Harwood C, Shields P, et al. Clinically significant human papilloma virus in squamous cell carcinoma of the head and neck in UK practice. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* 2012 Feb;24(1):e18–23

44. Cohan DM, Popat S, Kaplan SE, Rigual N, Loree T, Hicks WL Jr. Oropharyngeal cancer: current understanding and management. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009 Apr;17(2):88–94.

45. Fischer CA, Kampmann M, Zlobec I, Green E, Tornillo L, Lugli A, et al. p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann. Oncol.* 2010 Oct;21(10):1961–6.

46. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int. J. Cancer.* 2010 Mar 1;126(5):1256–62.

47. Pharynx. In: Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al., eds.: AJCC Cancer Staging Manual. 7th ed. New York, NY: Springer, 2010, pp 41-56.
48. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D; World Health Organization. Classification of tumors. Pathology and genetics head and neck. Lyon: IARC Press, 2005. 430 p.
49. Silva SD, Nonogaki S, Soares FA, Kowalski LP. p16 (INK4a) has clinicopathological and prognostic impact on oropharynx and larynx squamous cell carcinoma. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2012 Dec;45(12):1327–33.
50. Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int. J. Cancer.* 2012 Apr 15;130(8):1726–32.
51. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stutzer H, Preuss SF, Hoffmann TK, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int. J. Cancer.* 2007 Apr 15;120(8):1731–8.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A infecção pelo HPV é um fator de risco reconhecido na carcinogênese humana. A sua associação com o desenvolvimento do carcinoma da cérvix uterina é bem estabelecida, sendo uma fundamental consideração em programas de prevenção e detecção precoce, os quais foram capazes de reduzir dramaticamente a mortalidade por esta doença.

O reconhecimento do papel do HPV como um fator causal em neoplasias de outras regiões anatômicas é também de grande interesse. Nesse sentido, vários estudos apontam para um papel do HPV na carcinogênese da região de cabeça e pescoço. Entretanto, não há muitas informações disponíveis na literatura focadas especificamente no estudo da prevalência de infecção pelo HPV em pacientes com CEO.

Nesse contexto, o objetivo da autora foi verificar a frequência do HPV, utilizando-se as técnicas de imunistoquímica para P16 e CISH, como métodos isolados ou combinados, em pacientes com CEO e em pacientes sem neoplasia maligna.

Quando foram utilizadas as técnicas de imunistoquímica para P16 isolada ou combinada com a técnica de CISH, o estudo observou uma maior frequência do HPV no grupo de pacientes com CEO em relação ao grupo controle, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Como objetivos secundários, foram também analisados a frequências do HPV segundo a localização do tumor na orofaringe, o estadiamento clínico e o grau de diferenciação tumoral. Esses resultados não atingiram significância estatística.

Considerando-se a escassez de informações sobre o tema, tendo como base dados oriundos de nossa região geográfica, os resultados desta dissertação se revestem de significativa importância.

8. ANEXOS

Anexo A – Protocolo de investigação

Protocolo

Grupo:

- caso
- controle 1
- controle 2

Registro:

Idade:

Sexo: F M

Local da lesão:

- orofaringe local:
- cavidade oral local:

Anatomopatológico:

Estádio:

Grau de diferenciação do tumor:

- bem diferenciado
- moderadamente diferenciado
- pouco diferenciado

Tabagismo: sim não

Etilismo: sim não

Anexo B – Parecer da Comissão Científica do HCPA**HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO****COMISSÃO CIENTÍFICA**

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

Projeto: 120376

Data da Versão do Projeto:

Pesquisadores:

GILBERTO SCHWARTSMANN

LUCIA MARIA KLIEMANN

GERSON SCHULZ MAAHS

CARLA CUENCA SCHWARTSMANN

Título: ASSOCIAÇÃO ENTRE O PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV) E O CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE OROFARINGE: UM ESTUDO DE CASO-CONTROLE

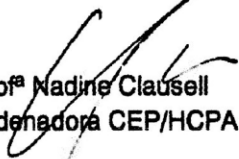
Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 23 de novembro de 2012.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora CEP/HCPA
