

LEANDRO BALDINO

**PREVALÊNCIA DO HPV E STATUS DA EXPRESSÃO DA P16 NA POPULAÇÃO
PORTADORA DE CARCINOMA DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE,
ASSOCIADOS À RESPOSTA TERAPÊUTICA**

Dissertação apresentada para obtenção
do título de mestre junto ao Programa de
mestrado em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Amazonas

AMAZONAS 2018

Universidade Federal do Amazonas-UFAM
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde

**PREVALÊNCIA DO HPV E STATUS DA EXPRESSÃO DA P16 NA POPULAÇÃO
PORTADORA DE CARCINOMA DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE,
ASSOCIADOS À RESPOSTA TERAPÊUTICA**

Pós-graduando: Leandro Baldino
Orientadora: Dra. Kátia Luz Torres Silva
Co-orientador: Dr. José Eduardo Levi

Dissertação apresentada para obtenção
do título de mestre junto ao Programa
de mestrado em Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Amazonas

Manaus – AM
Abril de 2018

B177a

Baldino, Leandro

Avaliação da Prevalência do HPV na População Portadora de neoplasia Maligna de Região de Cabeça e Pescoço e o Status do p-16 por Imunohistoquímica Associado a Resposta Terapêutica / Leandro Baldino. 2018

51 f.: 31 cm.

Orientadora: Kátia Luz Torres Silva

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amazonas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC – *American Joint Committee on Cancer*

CD-47 – *Cluster of differentiation 47*

DAHANCA – Danish Head and Neck Cancer

DNA – ácido desoxirribonucleico

ECOG – *Eastern Cooperative Oncology Group*

EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Tumoral

EUA – *Estados Unidos da America*

FAPEAM – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas

FCECON – Fundação Centro de Controle em Oncologia do Amazonas

g - força g (centrífuga)

Gy – Gray

HLA1 – antígeno leucocitário Humano

HPV – Papillomavirus humano

INCA – Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva

kDA - Kilodanton

mL - mililitro

Mg² – miligrama por metro quadrado

nM - nanomoles

ng - Nanogramas

OMS – Organização Mundial de Saúde

p16 – Proteína p16

pB - Pares de bases

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

qPCR - PCR em tempo real

RTOG – *Radiation Therapy Oncology Group*

uL - Microlitro

AGRADECIMENTOS

Devo agradecer primeiramente aos pacientes e seus familiares que são a razão desse estudo;

Aos meus pais pelo apoio incondicional e sólido e que me deram o suporte para chegar até aqui;

A minha esposa Hellen e meu filho Heitor pelas constantes alegrias e compreensões intermináveis;

A minha orientadora Dra. Kátia Torres que soube ter a paciência e objetividade de me orientar brilhantemente em todos os aspectos;

Ao Dr. José Eduardo Levi pela assessoria científica na condução do estudo;

A todos os amigos do grupo de pesquisa em HPV-FCECON , em especial à Dra. Valquíria Martins, Heidy Hallana Farah Rondon e a Vanessa Santos pelo suporte na coleta de dados e realização das análises moleculares;

Ao Dr. Marco Antônio Ricci que enquanto diretor da FCECON apoiou em todos os aspectos a pesquisa;

E por fim a todos que de uma maneira ou outra contribuíram para a realização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

Dedico em especial esse trabalho ao meu pai, João Batista Baldino que participou desde o início de minha vida com médico me dando o suporte necessário para me formar em medicina, me inspirando a escolher a radioterapia com especialização e participando de minha vida com profissional até os últimos dias de sua gloriosa vida profissional.

Que Deus cuide dele em qualquer lugar que esteja e que em breve voltaremos a nos encontrar. Te amo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise Descritiva da Idade dos pacientes estudados	33
Tabela 2 – Características do diagnóstico dos pacientes estudados	34
Tabela 3 - Característica do tratamento administrado aos pacientes estudados	36
Tabela 4 – Doses de radioterapia aplicadas	36
Tabela 5 – Relação entre os resultados do PCR e Imunohistoquímica	38
Tabela 6 - Relação entre o sexo, sítio anatômico e óbito e os resultados da PCR em tempo real para HPV16	39
Tabela 7 - Relação entre o sexo, sítio anatômico e óbito e os resultados da Imunohistoquímica (P16)	40
Tabela 8 - Seguintos de alguns pacientes estudados (n = 25).....	41

LISTA DE FIGURAS

Figura 2- qPCR HPV 16	29
Figura 3 – Frequência por sexo dos pacientes avaliados	33
Figura 4 – Frequência por faixa etária dos pacientes estudados	34
Figura 5 - Resultados para HPV por meio do PCR	37
Figura 6 - Resultados para detecção da expressão da P16 por meio da Imunohistoquímica	37

RESUMO

O Papillomavirus Humano (HPV) tem sido há muito tempo relacionado como o principal causador da neoplasia maligna do colo uterino. Com o avanço de novos métodos diagnósticos esse vírus também tem sido relacionado com outras neoplasias, como pênis, canal anal, próstata, pulmão e neoplasias de região de cabeça e pescoço. E nestes casos de cabeça e pescoço, a presença da infecção pelo HPV está relacionada com o prognóstico e tratamento da doença. Nas neoplasias de cavidade oral e orofaringe a relação com a infecção pelo HPV já tem sido estabelecida e a estratificação desses pacientes em grupos positivos ou não para o vírus ajuda a promover a melhor terapia e resposta ao tratamento. Este estudo visa avaliar a prevalência da infecção pelo HPV 16 nos pacientes com neoplasia de cavidade oral e orofaringe e estratificar em grupos de acordo com a expressão da proteína P16, relacionando com o tratamento radioterápico oferecido aos pacientes na FCECON tratados no período de 2009 a 2013 e a resposta ao tratamento. Foi analisado tecido parafinado de lesões de pacientes que foram segregados de acordo com o diagnóstico da neoplasia de cavidade oral e orofaringe, em grupos positivos ou não para o HPV 16. Foi feita análise da relação da presença da infecção com a resposta à terapia proposta (radioterapia e quimioterapia). Além disso, os pacientes foram estratificados em três grupos de acordo com a expressão da proteína P16: HPV16-negativo/P16 negativo, HPV16 negativo/P16 positivo e HPV16 positivo/P16 positivo. Com relação aos resultados 89,94% eram do sexo masculino, a média de idade foi de 60,77 anos, 64% apresentavam lesão em orofaringe e 36% em cavidade oral. A maior parte dos pacientes (93,7%) encontrava-se em estágio avançado. Observou-se a prevalência de 16,67% de positividade para a infecção pelo HPV16 e por fim na pesquisa do P16 observou-se que 18,52% foram positivos. Somente 3 pacientes atestaram positividade para ambos os exames (HPV16+ e P16+). O uso rotineiro da pesquisa de P16 por imunohistoquímica e a pesquisa do HPV na lesão em todos os pacientes com o diagnóstico de neoplasia de cavidade oral e orofaringe deve ser implantado, tendo em vista que há mudanças de estadiamento destas neoplasias quando positivas para HPV e melhora da resposta terapêutica.

Palavras chaves: HPV; P16, Neoplasias de cabeça e pescoço; Radioterapia.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Epidemiologia Geral	11
2.2 Epidemiologia de neoplasia de cabeça e pescoço	11
2.2 Genoma do Papillomavirus Humano e oncogênese	12
2.3 Proteína p16	13
2.4 Diagnóstico da infecção pelo HPV	14
2.5 Infecção pelo HPV e relação com o prognóstico dos tumores de cavidade oral e orofaringe	15
2.6 Infecção pelo HPV e tratamento das neoplasias de orofaringe e cavidade oral	17
3 JUSTIFICATIVA	21
4 OBJETIVOS	23
4.1 Geral	23
4.2 Específicos	23
5 Materiais e Métodos	24
5.1 Modelo do Estudo	24
5.2 População de Estudo	24
5.3 Critérios de elegibilidade	24
5.3.1 Critérios de Inclusão	24
5.3.2. Critérios de exclusão	24
5.4 Tamanho da população estudada	25
5.5 Variáveis estudadas	25
5.6 Procedimentos analíticos	25
5.6.1 Obtenção dos dados.....	25
5.6.2 Obtenção do material parafinado.....	26
5.6.3 Extração do DNA a partir de material em bloco de parafina	26
5.6.4 Controle interno da extração pela amplificação do gene da β -globina	28
5.6.5 Detecção do DNA do HPV 16 por PCR em tempo Real	28
5.6.6 Imunohistoquímica para detecção da expressão da proteína P16	30
5.6.7 Análise dos dados.....	31
5.7 Aspectos éticos	32
6 RESULTADOS	33
6.1 Caracterização da Amostra Estudada	33
6.2 Características Clínicas, Tratamento e Desfecho dos Pacientes Estudados	34
6.3 Detecção de HPV 16 por PCR em tempo real e Imunohistoquímica (P16)	36

7 DISCUSSÃO	42
8 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
ANEXO 1.....	51

1 INTRODUÇÃO

A neoplasia maligna da região de cabeça e pescoço é um grande problema de saúde pública no mundo. A última estimativa mundial apontou que ocorreriam cerca de 600 mil casos novos e 345 mil óbitos, para o ano de 2016, por câncer de boca e lábio, principalmente nos países em desenvolvimento (cerca de 80% dos casos) (OMS 2016). Nos Estados Unidos da América (EUA) 59 mil casos /ano e um total de 70% das neoplasia diagnosticadas tem relação com o Papillomavirus Humano (HPV) (Young *et al*, 2015). Nos USA houve um incremento de 225% em 30 anos em neoplasia de cabeça e pescoço causadas por HPV. A prevalência hoje para esta neoplasia vai desde 20 % na Inglaterra até 63% na Austrália (Shaikh *et al*, 2015). Na Ásia existem 314 mil casos de neoplasia de orofaringe e cavidade oral, com 200 mil mortes, sendo 40% relacionados com HPV (SHAIKH *et al*, 2015).

Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2018, 11.200 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres (INCA 2018). Tais valores correspondem a uma taxa bruta de incidência de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres. Na região Norte do país estes tumores ocupam a 11^a posição com taxa de 3,87 casos por 100 mil pessoas para homens e 1,37 casos por 100 mil mulheres (INCA, 2018).

Os principais fatores de risco para o câncer da cavidade oral são: tabagismo, etilismo, infecções por HPV (principalmente pelo genótipo 16) e exposição à radiação solar ultravioleta A (UVA) (muito relacionado ao câncer de lábio). Contudo, entre tais fatores, destacam-se o tabagismo e o etilismo (MIRGHANI *et al*, 2015). Estudos mostram um risco muito maior de desenvolver câncer na cavidade oral em indivíduos tabagistas e etilistas do que na população em geral. Ressaltam ainda um aumento no risco de acordo com o tempo que a pessoa fuma, com o número de cigarros fumados por dia e com a frequência de ingestão de bebidas alcoólica (BRITTA *et al*, 2013; MIRGHANI *et al*, 2015). A relação dos tumores de cabeça e pescoço com o tabagismo tem sido evidenciada pelo decréscimo de suas taxas muitas vezes devido a campanhas de diminuição para o uso de álcool e tabagismo (MIRGHANI *et al*, 2015).

As taxas de incidência para câncer de cavidade oral relacionado à infecção pelo HPV, como amígdala, base da língua e orofaringe, vêm aumentando entre a população de adultos jovens em ambos os sexos. Parte desse aumento pode ser em razão de mudanças no comportamento sexual. Os pacientes infectados pelo HPV

(HPV+) tem em sua maioria, maior número de parceiros sexuais, maior frequência de sexo oral e um nível educacional elevado (DALHSTROM *et al*,2015).

O HPV está comprovadamente associado com a oncogênese das neoplasias de cavidade oral. A infecção tem relação também com a resposta e prognósticos de tratamento. O potencial oncogênico do HPV está ligado à integração do DNA viral ao núcleo celular resultando em desregulação da expressão da oncoproteína E6 e E7. (MARKUS *et al*,2014). A proteína 16 (p16) é um supressor tumoral que em pacientes com o diagnóstico de neoplasia relacionada ao HPV apresentam uma hiperexpressão (FONMARTY *et al* ,2015).

Está bem estabelecida a relação entre o status de infecção viral e o prognóstico e definição terapêutica (principalmente de radioterapia e quimioterapia) para os tumores de cavidade oral e orofaringe. Três status de infecção são esperados: HPV-negativo/P16 negativo, HPV negativo/P16 positivo e HPV positivo/P16 positivo. Pacientes com HPV positivo/P16 positivo são mais jovens e respondem melhor ao tratamento que pacientes com HPV negativo/P16 negativo, pois, associado a isso, não estão fatores de risco como tabagismo e etilismo encontrados em pacientes mais velhos (Eleni *et al*, 2015). Pacientes HPV positivo tem uma redução de 28-58% no risco de mortalidade quando comparados ao HPV negativo, além de possuírem um risco bem diminuído de um segundo tumor primário (MIRGHANI *et al*, 2015).

A definição do status do HPV dos pacientes que irão ser submetidos ao tratamento oncológico vem sendo pesquisado em diversos protocolos (Danish Head and Neck Cancer Study-DAHANCA 5, Tirapazime Radiation Oncology Group-TROG 02.02 e Radiation therapy oncology Group-RTOG 129) afim de se estudar e definir estratégia individual de acordo com o status de HPV (RANDALL *et al*,2013,YOUNG *et al* ,2015;LOREDANA *et al*,2015).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia Geral

Os casos de neoplasia maligna têm cada vez mais aumentado no mundo inteiro, não somente pela mudança de hábito alimentar (dietas pobres em fibras e rica em gorduras) e de vida (fumo, álcool e sedentarismo), mas também pelo avanço de novos exames diagnósticos que proporcionam cada vez mais o diagnóstico precoce. Essas neoplasias sempre trazem algum grau de morbidade ao paciente aumentando também os custos do estado com o tratamento cada vez mais oneroso (BRITA *et al*,2015).

As neoplasias ligadas ao Papillomavirus Humano (HPV) tem se tornado cada vez mais frequentes. A mais conhecida e estudada é a neoplasia de colo uterino que é reconhecidamente um grande problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento. Mas esse vírus também tem sido relacionado com diversas outras neoplasias como de canal anal, pênis e neoplasia de região de orofaringe e cavidade oral (SHIFFIMAN *et al* ,1993, BOSH *et al*,1992, HUSAIN ,2016). Essa última por ser uma neoplasia bastante frequente na população mundial tem sido o foco de diversos estudo, os quais têm tentado correlacionar o diagnóstico com a prevalência do HPV, descobrindo ainda novas opções terapêuticas e respostas ao tratamento (BRITTA *et al*,2015).

2.2 Epidemiologia de neoplasia de cabeça e pescoço

O HPV como causador de neoplasia de cabeça e pescoço foi primeiramente descrito em 1983 por Syrta (TAKAKO,2018).

As neoplasias de orofaringe são responsáveis por 635 mil novos casos/ano no mundo levando a 350 mil óbitos. Os EUA são responsáveis por 6 mil novos casos ao ano (GRACE *et al*,2013, SHAIKY *et al*, 2015). Houve um incremento de 28-68% entre 1985 a 2012 com aumento das taxas de 2,5% ao ano (TAKAKO ,2018).

Neoplasia quando associado ao HPV é mais prevalente em países desenvolvidos (Japão o mais prevalente no mundo) e menos nos mais pobres (continente africano menos prevalente) (HUSAIN, 2017). Nos EUA houve um incremento de 225% em 30 anos em neoplasia de cabeça e pescoço causadas por

HPV, já é a oitava neoplasia mais frequente (TRIBIUS et al, 2011). A prevalência hoje para esses casos vai desde 20 % na Inglaterra até 63% na Austrália (SHAIKH et al,2015). Em 2020 é bem provável que os casos de neoplasia de orofaringe HPV positivo suplantem os casos de neoplasia de colo uterino em todo o mundo (GRACE C et al,2013).

Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2018 11.140 casos novos de câncer da cavidade oral e orofaringe em homens e 4.350 em mulheres. Tais valores correspondem a uma taxa bruta de incidência de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres. Na região Norte do Brasil a taxa é de 1,60/100 mil e o tumor ocupa a 11ª posição (INCA, 2018).

Nas neoplasias de orofaringe e cavidade oral a detecção do HPV está presente em cerca de 20-70%. Entre 2000 até 2010 houve um aumento de 71% na detecção do HPV como fator etiológico do câncer de orofaringe e cavidade oral e redução de 50% nos casos HPV negativo e a maior incidência está entre os tipos 16 e 18 do HPV (90% e 16% respectivamente) (TRIBIUS et al,2011). Em países como a Suécia a prevalência das neoplasias de orofaringe e cavidade oral associados ao HPV totaliza 90% dos casos (SAIKY et al ,2015). Em alguns casos com as neoplasias de tonsila e base de língua o HPV já é responsável por 100% dos casos (ALLISON et al,2016).

2.2 Genoma do Papillomavirus Humano e oncogênese

O HPV é um pequeno vírus DNA não envelopado que infecta células epiteliais, levando a lesões em sua maioria benigna e os HPVs de alto risco (16 e 18) estão associados a alterações malignas (TANAKA,2017). O vírus tem um genoma circular duplo de DNA com cerca de 8 mil pares de bases organizado em genes “recentes” (E1 a E7) e genes “tardios” (L1 e L2). Enquanto os genes tardios são proteínas estruturais, os genes recentes codificam oncoproteínas (E5, E6 e E7) necessárias para a patogenia do vírus (DOORBAR, 2015). A proteína E5 tem maior poder antiapoptótico e a E6 e E7 são necessárias para a replicação do DNA viral. Após a infecção pelo HPV há uma integração do DNA do vírus com o núcleo da célula, levando a uma desregulação da expressão da oncoproteína E6 (esta interfere na P53 que é um supressor tumoral diminuindo a apoptose) e E7 (esta rompe o ciclo celular havendo uma proliferação descontrolada de células e posterior transformação maligna), tanto o E6 quanto o E7 promovem a proliferação e sobrevivência da célula

evitando a resposta imune e a instabilidade genética (DOORBAR *et al*,2015). Há uma disfunção do sistema de proteção ao dano do DNA da célula que permite a evolução da doença até a formação da neoplasia. Isso leva a uma maior sensibilidade do tecido a radioterapia e quimioterapia (GARREN *et al*,2016).

Terapias que interrompem a disfunção de E6 e E7 pode melhorar a resposta da neoplasia ao tratamento. O VX-3100 tem essa função e já vem sendo testado (GARREN , ET AL 2016).

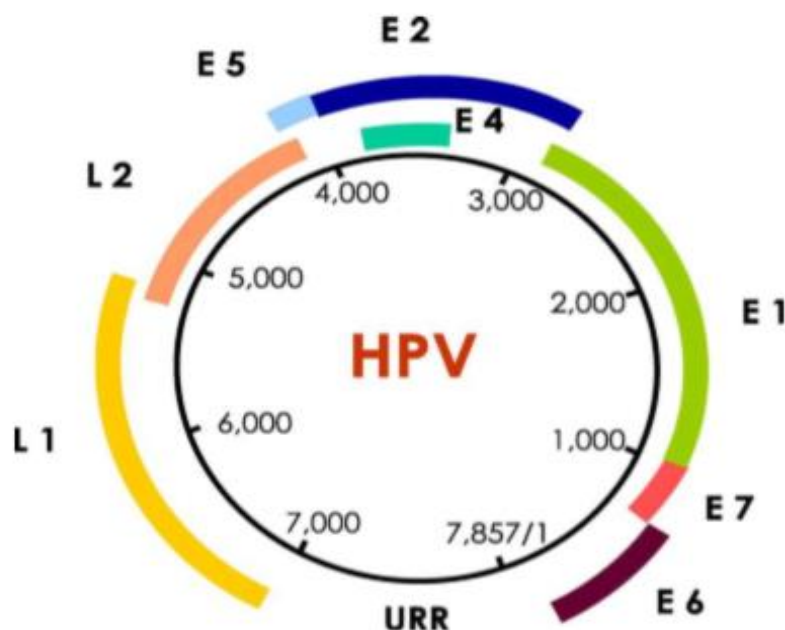


Figura 1. Esquema representativo do genoma do HPV. Fonte: Muñoz *et al.*(2006)

2.3 Proteína p16

A progressão do ciclo celular a partir da fase G1 é regulada por ciclinas, através da formação de complexos com proteínas quinase ciclina-dependentes (CDK). Esses complexos ciclina-CDK têm a função de regular a fosforilação de proteínas relacionadas à progressão do ciclo celular. O gene P16INK4a codifica a proteína p16 a qual regula negativamente a progressão do ciclo celular, atuando como inibidor de CDK 4/6 e, desta forma, bloqueando a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRB). A pRB, por sua vez, exerce efeitos antiproliferativos por meio do controle da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Em sua forma ativa, hipofosforilada,

pRb está ligada ao fator de transcrição E2F, bloqueando sua ação e mantendo a célula na fase G1. Quando fosforilada, a pRB torna-se inativa e libera o fator E2F, o qual induz a progressão do ciclo celular para a fase S (FERRAZ et al., 2012; OGUEJIOFOR et al., 2013; PANNONE et al., 2012).

A oncoproteína viral E7 inibe a atividade da pRB por ligar-se a esta proteína, liberando o fator E2F, desencadeando o processo de replicação do DNA e aumentando a proliferação das células do epitélio infectado. O gene P16INK4a, por sua vez, tem sua expressão controlada por feedback negativo exercido pela pRB, conforme figura 3. Assim, a inativação de pRB por E7 resulta no acúmulo de p16 nas células infectadas. A oncoproteína viral E7 também é capaz de ligar-se a p21 e p27, as quais também atuam como CDKIs, o que contribui para o descontrole do ciclo celular em diferentes pontos de checagem (FERRAZ et al., 2012; OGUEJIOFOR et al., 2013; PANNONE et al., 2012).

O gene supressor de tumor P53 é responsável por ativar genes envolvidos no controle do ciclo celular, reparo do DNA e indução da morte celular por apoptose. Desta forma, atua impedindo a progressão de células com danos genéticos no ciclo celular, favorecendo mecanismos de reparo do DNA e, caso o reparo não seja efetivo, ativa mecanismos que induzem à apoptose. O gene P16INK4a, cuja transcrição é ativada por p53, realiza a parada do ciclo celular, conforme descrito anteriormente; GADD45 pode então reparar o dano ao DNA; e o gene BAX induz apoptose nas células cujo dano ao DNA foi irreversível. A oncoproteína viral E6 liga-se à p53, promovendo sua degradação por proteassomo, causando instabilidade cromossomal, imortalização e proliferação anormal das células transformadas, favorecendo assim o desenvolvimento tumoral. Além disso, a oncoproteína E6 é capaz de degradar a proteína BAX em queratinócitos humanos, impedindo a apoptose (FERRAZ et al., 2012; PANNONE et al., 2012). Desta forma, compreendendo os mecanismos de modificação do ciclo celular promovidos pelo HPV, tem sido proposto utilizar p16 como um indicador da participação viral na carcinogênese dos tumores de origem epitelial. No entanto, até o momento não há um consenso estabelecido para esta aplicação e alguns estudos têm mostrado não existir uma correlação absoluta entre a presença do HPV e o acúmulo de p16 (WENDT; ROMANITAN; ANDERS, 2013; ZARAVINOS, 2014).

2.4 Diagnóstico da infecção pelo HPV

Métodos de identificação do HPV têm sofrido avanços no decorrer da última década na tentativa de facilitar cada vez mais seu diagnóstico permitindo melhor conduta e terapêutica. Os ensaios envolvendo a reação de cadeia da Polimerase (PCR e PCR em tempo real) são altamente sensíveis e mais comumente utilizados (ANDERSON, 2015).

Ultimamente exames mais avançados realizam o sequenciamento inteiro do genoma com fins de determinação do genótipo ou de identificação de isótopos virais envolvidos nas infecções (Liu,2015).

A genotipagem do HPV tem pouca aplicabilidade em neoplasia de orofaringe, pois 90% são do tipo 16, não mudando forma de tratamento. Ainda na detecção, os anticorpos presentes contra proteínas do HPV16 (E6 e E7) indicam um risco de 76% maior para câncer de orofaringe quando comparado com anticorpos negativos (RAMPIAS *et al*, 2014). A detecção do HPV16 fixado em formol depende diretamente da qualidade da extração do DNA, DNA com pouca qualidade leva a resultados falso positivos. (BIESAGA, *et al* 2016).

2.5 Infecção pelo HPV e relação com o prognóstico dos tumores de cavidade oral e orofaringe

Em pacientes com neoplasia de orofaringe e cavidade oral, fazer a distinção entre positivos para HPV daqueles negativos, é hoje essencial para a tomada de condutas terapêuticas (Hong *et al*, 2016). Os pacientes portadores de neoplasias com HPV positivo, são em sua maioria homens (com risco 5 vezes maior), mais jovens, não fumantes, brancos, possuem melhores condições socioeconômica, sem uso de álcool, múltiplos parceiros sexuais, tumores menores e com linfonodos positivos. Em termos de respostas ao tratamento, esses também têm melhor sobrevida, recorrência menor, menos tumores secundários e menos metástases a distância (GRACE C *et al*, 2013; LIU *et al*, 2015).

Liu *et al* (2015) avaliaram a concordância da pesquisa do HPV por PCR e da proteína p16 por imunohistoquímica e observaram que somente 21 pacientes de 184 avaliados (11,41%) não tiveram resultado compatíveis. Neste mesmo estudo foi observado que pacientes HPV+/P16+ tiveram a melhor sobrevida nos diversos grupos.

Diversos estudos retrospectivos têm demonstrado a importância da pesquisa da presença de HPV nos pacientes com neoplasias de cabeça e pescoço. O estudo *DAHANCA 5* randomizou 440 pacientes com o diagnóstico de neoplasia de orofaringe e cavidade oral em grupos com o p16 + e p16 – (tratados com radioterapia e quimioterapia (nimorazole). Os pacientes com HPV + tiveram um aumento do controle local quando comparados com o livres de infecção (58% e 28% respectivamente) e diminuição da mortalidade específica também quando comparados com os HPV negativos (*DAHANCA 5,2017*).

O estudo *TAX 324* avaliou o status do HPV-DNA em pacientes com o diagnóstico de neoplasia de orofaringe e dos 237 avaliados 68 eram positivos para HPV e tiveram uma melhora da sobrevida global em 5 anos (82% contra 35% em pacientes HPV negativo). A sobrevida livre de progressão de doença variou em 5 anos de 78% para pacientes HPV positivos contra 28% para negativos (*Eleni et al, 2016*).

O estudo *TROG 02.02* randomizou 861 pacientes com neoplasia de orofaringe em receberem radioterapia associado a cisplatina versus radioterapia associado a cisplatina e tirapazina; 172 pacientes foram avaliados para o status do HPV, 102 (59%) foram positivos para HPV-DNA e 70 (41%) negativos. Os pacientes HPV + tiveram melhora na sobrevida global em 3 anos em relação aos pacientes negativos (63% x 28%) (*TROG 02.02*).

Outro estudo (*RTOG 0129*) avaliou 323 pacientes com neoplasia de orofaringe, dos quais 206 pacientes eram HPV-DNA positivos e, 92% foram positivos para p16. A sobrevida global em 3 anos foi de 82% contra 57% para HPV-DNA +, assim como a sobrevida livre de doença 74% contra 43% respectivamente. Ainda nesse estudo observou-se que o tabaco está associado ao aumento do risco de morte em ambos os grupos de pacientes (*ELENI et al,2016*).

Dentro dos estudos retrospectivos uma metanálise de 60 estudos com 5046 pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço (2642 de orofaringe e cavidade oral) foi encontrado 60% dos pacientes com HPV DNA positivos desses 87% eram HPV16 (*ELENI et al,2016*).

Diante dessa melhora em relação aos tumores HPV negativos em 2016 foi criado pela *American Joint Committee on cancer (AJCC)* um novo estadiamento para lesões causadas por HPV positivo. Em relação as mudanças principalmente só há dois tipos de N, N1 com até 4 linfonodos e N2 com mais de 4 linfonodos e foi eliminado o N3. Os demais continuaram o mesmo (*HUSAIN, et al,2017; BELTZ A,2018*).

2.6 Infecção pelo HPV e tratamento das neoplasias de orofaringe e cavidade oral

Dentro dos estudos prospectivos para a determinação da relação entre o HPV+ e fatores prognósticos. O *University of Michigan Cancer Center-UMCC 9921* avaliou 66 pacientes com neoplasia de orofaringe e cavidade oral dos quais 42 pacientes foram analisados para a presença de HPV. Vinte e sete 27 foram HPV-DNA positivos e 15 HPV-DNA negativos, a sobrevida global e específica foi significativamente melhor em pacientes HPV positivos ($p=0.0001$ e 0.0008) (Kristen B. et al, 2014).

No *European Oncology Group-ECOG 2399*, 105 pacientes portadores de neoplasia de orofaringe e cavidade oral foram avaliados e em 96 pacientes o status do HPV-DNA foi determinado. Observou-se que 38 pacientes foram positivos e 58 negativos. As respostas ao tratamento foram melhores em pacientes com HPV positivo (84% x 27%) e principalmente a sobrevida global em 3 anos foi maior para o grupo positivo (95% x 62%) (Kristen B. et al, 2014).

Um grande número de estudos tem descrito o status do HPV em neoplasias de orofaringe e cavidade oral influenciando na mudança nos tratamentos, seja na quimioterapia, na radioterapia ou até mesmo na cirurgia. Em geral são propostas alternativas de quimioterapia e a redução da dose da radioterapia, além da diminuição da cirurgia e suas morbidades.

O *Radiation Oncology Group-RTOG 1016* (fase 3) tem avaliado a resposta dos pacientes tratados com radioterapia comparado com os tratados por quimioterapia (cisplatina ou cetuximabe). O estudo avalia se os pacientes com HPV-DNA positivo podem abdicar da cisplatina como padrão de quimioterápico (Geiger et al, 2014). Outro estudo semelhante foi realizado no *Mount Sinai School of Medicine* que randomizou pacientes HPV positivos em receber a carboplatina + cetuximabe com radioterapia (56Gy-dose reduzida) ou carboplatina e radioterapia com dose máxima (70Gy) e avaliou a redução da dose de radioterapia (Geiger et al, 2014).

Outros estudos têm relacionado os pacientes HPV+ a serem submetidos a terapia de indução e aguardando a resposta prevendo o maior controle tumoral e aumentando o controle das doenças a distância, ou após a terapia de indução diminuir a dose de radioterapia diminuindo os efeitos colaterais e aumentando o prognóstico (ECOG 1308) (GEIGER et al, 2014).

No Amazonas já foi realizado um trabalho parecido que avaliou os pacientes com biópsia que confirmava carcinoma epidermóide de cavidade oral, e foram relacionados com a frequência do HPV e o polimorfismo do P53. Neste estudo 72% dos pacientes eram HPV positivo (BENEVIDES et al, 2007).

Uma próxima geração de pesquisas tem sido direcionada para avaliação das terapias alvos dos receptores do Fator de Crescimento Tumoral (EGFR) em pacientes com HPV positivo. Dois estudos têm mostrado contrastes sobre o papel desses inibidores de EGFR um com melhora aparente quando usado em pacientes HPV positivo outros sem melhora ou até com resultados superiores em pacientes HPV negativo (YAPIN Su et al, 2017). Três trabalhos randomizados em andamento tentam avaliar a importância no tratamento das neoplasias de cabeça e pescoço ligadas ao HPV, embora RTOG1016, De Escalate e o TROG 12.01 mostram resultados ainda duvidosos sobre o uso nesses pacientes (MARCUS et al, 2015).

A literatura tem demonstrado o real papel da hipóxia tecidual como fator independente de prognóstico. Danish Head Group demonstrou que células HPV negativo tem maiores taxas de hipóxia que os HPV positivos. Mais hipóxia resulta em mais necrose levando a uma maior resistência as terapias. A CA-IX é uma enzima transmembrana que normalmente encontra-se aumentada em meio acidificado em hipóxia, normalmente em pacientes HPV negativo, apesar de não estar implicada em prognóstico pode demonstrar a maior resistência ao tratamento (OU et al, 2017). Dois estudos prospectivos (DAHANCA e TROG 02.02) tem investigado o efeito dos modificadores de hipóxia (nimorazole e tirapazamina) e em ambos os estudos houve uma melhora expressiva local e regional em pacientes com HPV negativo e nenhuma alteração naqueles HPV positivo (Brita et al, 2016).

A utilização de modificadores de hipóxia tem gerado diversos estudos tentando definir a importância dessas drogas. O DAHANCA 18 avaliou novamente o uso do Nimorazole (sensibilizador de hipóxia) associado a cisplatina e radioterapia na resposta desses pacientes confirmando o resultado da melhora da resposta com o uso principalmente em pacientes HPV positivo. O TROG02.02 que comparou a radioterapia e cisplatina com a Trapazamine (citotoxina de células em hipóxia) e confirmou o contrário que somente os pacientes HPV negativo respondem ao uso dessa droga. Sendo assim ainda está em aberto a utilidade desses medicamentos no tratamento dos pacientes (MARCUS et al, 2015).

Recentes pesquisas demonstraram que não só a infecção pelo HPV é suficiente para a formação da neoplasia, mas que o sistema imune está ligado intimamente com a formação tumoral. A radiação tem papel fundamental no tratamento pois induz a perda do CD47 em tecidos com HPV positivo aumentando a resposta tecidual (SHAO et al, 2013).

Avaliando algumas células do sistema imune pode-se ter um indício de qual caminho será adotado para definir prognóstico e tratamento dos pacientes. Pacientes HPV positivo com alta carga de células T CD8 tem um melhor prognóstico quando comparados com os de menor carga (84% x 55%). O Human leukocyte antigen-HLA1 quando presente em células HPV positivo tem uma melhora na sobrevida. Inversamente o linfócito T CD4, e as células CD3 e as células CD44 não demonstraram significância no prognóstico desses pacientes (SABER et al, 2015).

Mesmo após o tratamento das neoplasias os níveis séricos de HPV 16 se mantêm elevados porém sem impacto na tentativa de ser um bom marcador de recorrência, diferente do que já está sendo demonstrado para câncer de colo de útero (TANAKA, et al, 2018; NAIR et al, 2018; GHEBRE et al 2018).

Por fim diversos estudos têm levantado as hipóteses que os oncogenes virais tem um papel importante na sensibilidade as terapias. Baixos níveis de P53 selvagem presente em células HPV positivas resultam em maior morte celular assim como essas células também tem uma falha no reparo do dano do DNA se tornando mais sensíveis a ação da radioterapia e quimioterapia (Panwar et al, 2014). Quando se avalia a importância da P53 mutável (proteína citoplasmática com massa molecular 53kDA que regula o crescimento tumoral) pode-se constatar que pacientes HPV positivo têm uma carga menor em sua composição levando a um melhor prognóstico pois uma carga maior de P53 corresponde a uma menor sobrevida (DONG et al, 2015).

O que se sabe a respeito dos pacientes HPV positivo é: As células HPV positivo tem uma maior instabilidade em responde ao dano da radiação; existem poucos oncogenes mutados; Há a presença da expressão de P53; Há maior presença de CD8 e células T; baixos níveis de hipóxia; Há mais células no ciclo celular sensível à radiação (fase tardia G2); existem menos células nas fases menos sensíveis à radiação (fase S); há uma melhor resposta imune; os tumores são menores; os pacientes HPV+ não são fumantes (FONMARTY, et al, 2015).

Desde o reconhecimento do HPV como agente causador de diversas neoplasias cada vez mais tem-se buscado formas de detecção do mesmo e

caracterização dos pacientes conforme o status do HPV nas células. Essa estratificação influi na conduta e prognóstico dos pacientes alterando formas de tratamento. Estudos prospectivos ainda em andamento vão realmente determinar quais são essas diferenças, as respostas e quais devem receber determinada terapia, e devem responder algumas questões ainda sem respostas como: até quando a cirurgia é necessária? Quando deve-se reduzir a dose de radioterapia e campo de tratamento? É necessário a quimioterapia? Qual? Vacinação é eficaz para controle de neoplasia de orofaringe e cavidade oral? Os homens são protegidos? O tabaco piora o prognóstico em pacientes com HPV positivo ou não influencia?

Dessa forma estratificar os pacientes do estado do Amazonas e separar de acordo com o status do HPV é de suma importância pois irá mostrar a real condição de nossos pacientes e podem direcionar futuramente novas terapias conforme a resposta ao tratamento dos mesmos.

3 JUSTIFICATIVA

As estimativas mundiais para os tumores de cavidade oral e orofaringe apontam a ocorrência de cerca de 600 mil casos novos e 345 mil óbitos ao ano, principalmente nos países em desenvolvimento (cerca de 80% dos casos) (OMS, 2016).

O Brasil por ser um país em desenvolvimento e sem uma política pública de prevenção de neoplasias, apresenta incidência e prevalência com números alarmantes e também grande número de pacientes com prognóstico diminuído devido aos tumores serem avançados e o estado geral dos pacientes bem deteriorados ao diagnóstico.

No estado do Amazonas a realidade não é diferente, devido a diversos fatores (distâncias, isolamento populacional, desconhecimento, falta de acesso a assistência médica) esses pacientes apresentam-se ao serviço especializado com neoplasia com estadiamento bastante avançado e com dificuldades em iniciar o tratamento.

A oncologia tem cada vez mais tentado estratificar os pacientes em grupos com diferentes características para que os mesmos recebam o tratamento de acordo com seu tipo tumoral, estadiamento, idade e *performance status*. A pesquisa de outros fatores, que possam contribuir para os prognósticos dos pacientes cada vez mais tem avançado e a escolha de qual terapia irá ser usada dependerá desses fatores.

A pesquisa da relação do HPV com essas neoplasias e a estratificação em grupos de acordo com o status do P16 pode oferecer o melhor tratamento a esses pacientes e aumentar a vigilância naqueles que sabemos ser de pior prognóstico. Os pacientes com neoplasia de orofaringe e cavidade oral devem no momento da biópsia de diagnóstico ser estratificados e realizar a pesquisa do HPV, a fim de programar a terapia e definir prognóstico adequado para cada caso.

Os pacientes HPV positivo (normalmente mais jovens, sem uso de álcool e fumo) possuem uma melhor resposta local e de sobrevida global em relação aqueles pacientes com HPV negativo (mais velhos, usuários de álcool e fumo). Esses pacientes (HPV positivo) também se apresentam com a neoplasia em estádios mais iniciais e com menos linfonodomegalias (SHAO et al ,2013).

Este estudo tem a grande importância de caracterizar os pacientes com neoplasia de orofaringe e cavidade oral no estado do Amazonas estabelecendo relações entre idade, sexo, estadiamento, características tumorais e o *status do HPV*.

Assim poderão ser propostas estratégias para o tratamento adequado com a realidade do estado e da região norte.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Analisar a associação da infecção pelo HPV com o prognóstico das neoplasias de cavidade oral e orofaringe de pacientes atendidos na Fundação CECON de janeiro de 2009 a dezembro de 2013.

4.2 Específicos

- Descrever o perfil sociodemográfico e clínico dos pacientes portadores de neoplasia de cavidade oral e orofaringe inseridos no estudo;
- Descrever a frequência da infecção por HPV 16 entre os pacientes estudados;
- Descrever a frequência da expressão da proteína P16 em pacientes com neoplasias de cavidade oral e orofaringe atendidos na Fundação CECON;
- Associar a presença de marcadores de infecção pelo HPV com o prognóstico das neoplasias de cavidade oral e orofaringe;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Modelo do Estudo

Estudo observacional, transversal e retrospectivo de análise de material parafinado dos pacientes com o diagnóstico de neoplasia de cavidade oral e orofaringe submetidos à radioterapia na FCECON no período de Janeiro de 2009 a Dezembro de 2013, a fim de avaliar a associação da infecção pelo HPV com o prognóstico das neoplasias.

5.2 População de Estudo

O estudo foi realizado envolvendo os pacientes com diagnóstico de neoplasia de cavidade oral e orofaringe atendidos no serviço de radioterapia da Fundação Centro de Controle em Oncologia – FCECON no período de Janeiro de 2009 a dezembro de 2013.

5.3 Critérios de elegibilidade

5.3.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos todos os pacientes, atendidos no setor de Radioterapia da FCECON no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2013, que tinham como único diagnóstico o carcinoma de cavidade oral e/ou orofaringe.

5.3.2. Critérios de exclusão

Foram excluídos dos ensaios para pesquisa de HPV os pacientes cujos blocos de parafina estiveram inacessíveis ou em condições de conservação que inviabilizaram a realização dos ensaios laboratoriais.

5.4 Tamanho da população estudada

A partir de um banco de dados do serviço de radioterapia da FCECON, foram catalogadas 212 pacientes com neoplasias de cavidade oral e/ou orofaringe que receberam atendimento no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2013. Este estudo visou avaliar todos os pacientes cadastrados que apresentassem material viável.

5.5 Variáveis estudadas

Para estabelecer o perfil sociodemográfico e clínico dos pacientes, as variáveis estudadas foram: gênero, idade, tipo histológico do tumor, estadiamento ao diagnóstico, tratamento empregado, dose de radioterapia, histórias de risco (tabagismo e etilismo).

Para a análise de associação da presença de marcadores de infecção pelo HPV com o prognóstico das neoplasias de cavidade oral e orofaringe foi avaliada a presença ou ausência do DNA do HPV, a expressão da proteína P16 e os desfechos clínicos sejam eles o óbito do paciente ou o último registro clínico descrito no prontuário (pois muitas vezes ocorre a perda de seguimento por abandono do tratamento).

Os dados foram compilados em formulário de coleta de dados (anexo 1).

5.6 Procedimentos analíticos

5.6.1 Obtenção dos dados

Os prontuários foram acessados no SAME da FCECON (arquivo ativo e arquivo inativo) e no serviço de radioterapia da mesma instituição. Dos prontuários e registros foram extraídos os dados sociodemográficos e dados clínicos e de tratamento do paciente.

5.6.2 Obtenção do material parafinado

Os blocos de parafina para pesquisas foram obtidos no laboratório de patologia da FCECON e nos demais laboratórios conveniados com a instituição e naqueles que os pacientes optaram em encaminhar as peças e que realizaram a análise.

Os blocos de parafina foram separados por ordem cronológica e armazenados em temperatura ambiente até o momento da microtomia. Após a coleta dos blocos os mesmos foram levados ao setor de microtomia do laboratório de patologia e foram realizados 10 cortes sequenciais de 3 micra de espessura utilizando micrótomo com lâminas descartáveis ou descontaminadas através de procedimentos padronizados (a fim de evitar contaminação entre as amostras). Sendo que 8 foram armazenados em microtubos de 2,0mL (DNAase e RNAase *free*) identificados com a codificação atribuída para cada caso coletado. Os mesmos foram conservados em temperatura ambiente e depois encaminhados ao laboratório de diagnóstico molecular da Fundação CECON para extração do DNA.

O material restante no bloco de parafina dos pacientes foi encaminhado para o laboratório Hermes Pardini para a realização das técnicas de imunohistoquímica.

5.6.3 Extração do DNA a partir de material em bloco de parafina

Os cortes de parafina foram inicialmente submetidos a uma etapa de desparafinação com óleo mineral seguindo-se o seguinte protocolo:

1. Adição de óleo mineral à amostra:
 - Para seções ≤ 50 microns, foram usados 300 μ l de óleo mineral.
 - Para seções > 50 microns, foram usados 500 μ l de óleo mineral.
2. Incubação à 80 ° C durante 1 minuto – sem agitação
3. Vortex para misturar.
4. Incubação à 80 ° C durante 2 minutos – sem agitação
5. Vortex para misturar.

A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit comercial da Qiagen. Inicialmente foi realizada etapa de lise das amostras seguindo-se o protocolo abaixo:

1. Adição de 300 μ l de PBS (AUTOCLAVADO) à amostra.
2. Centrifugação à 10 000 \times g durante 15 segundos à temperatura ambiente.

Duas fases são formadas, um azul inferior (aquoso) e uma fase superior (óleo). O

tecido deve ficar disperso no fundo do tubo. Caso não tenha ficado deve-se desprendê-lo com a ajuda de uma ponteira virgem.

3. Adição de **20 µl** de Proteinase K diretamente à fase azul inferior; Misturando-se a fase inferior por pipetagem.

4. Incubação a 65 ° C durante 1 hora em agitação leve;

5. Incubação a 80 ° C durante 4 horas sem agitação;

6. Normalização do material para temperatura ambiente;

7. Centrifugação breve à temperatura ambiente suficiente para coletar a condensação;

Em seguida foi realizada etapa de tratamento com Rnase seguindo-se o protocolo abaixo:

1. Adição de 10 µl de RNase diretamente à amostra lisada na fase azul inferior. Deve ser feita mistura a fase inferior por pipetagem;

2. Incubação à temperatura ambiente durante 5 minutos;

3. Adição de 220 µl de BL Buffer à amostra lisada;

4. Adição de 240 µl de etanol gelado (95-100%) com agitação em vortex brevemente para misturar.

5. Centrifugação à 10 000 × g durante 15 segundos à temperatura ambiente. Duas fases são formadas, um azul inferior (aquoso) e uma fase superior (óleo);

6. Para cada amostra a ser processada, foi utilizada uma Coluna de extração posicionada sobre um dos Tubos de Coleta fornecidos pelo kit;

7. Transferência de toda a fase azul inferior (aquosa) da amostra, incluindo qualquer precipitado que tenha se formado, para o conjunto da Coluna de extração / Tubo de Coleta, e tampa a coluna. Foi descartado o óleo mineral restante;

8. Centrifugação do conjunto à 10 000 × g por 30 segundos à temperatura ambiente;

9. Descarte do fluxo e posicionamento da mesma coluna de extração no Tubo de Coleta;

10. Iniciar a lavagem e eluição da coluna conforme adicionando adicionando 500 µl de solução de lavagem 1X (com o etanol adicionado) na coluna de extração, tampando-a em seguida;

11. Centrifugação à 10 000 × g durante 30 segundos à temperatura ambiente;

12. Descarte do fluxo e reposicionamento da coluna de extração no mesmo Tubo de Coleta usado para a ligação do DNA;

13. Adição de 500 µl de solução de lavagem 1X à coluna de extração, fechando a tampa do tubo;
14. Centrifugação à 10 000 × g durante 30 segundos à temperatura ambiente;
15. Descarte do fluxo e reposicionamento da coluna de extração no Tubo de Coleta Usado para a ligação do DNA;
16. Com a tampa aberta da coluna/tubo coletor é realizada a centrifugação em 16,000 × g durante 3 minutos à temperatura ambiente para secar a coluna;
17. Transferência da coluna de extração para um tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpo (não fornecido pelo kit) e descarte do tubo coletor;
18. Adição de 30-50 µl de tampão de eluição à coluna, seguido de fechamento da tampa da mesma;
19. Centrifugação à 16,000 × g durante 1 minuto à temperatura ambiente seguido de remoção e descarte da coluna de extração.
20. Separação e armazenamento do tubo de microcentrífuga contendo o DNA eluído à -30 a -10 ° C;

5.6.4 Controle interno da extração pela amplificação do gene da β-globina

A detecção do gene da β-globina foi amplificada por reação em cadeia da polimerase para avaliar a integridade do DNA extraído, a fim de evitar os resultados falsos negativos. As sequências dos primers utilizados para amplificação de β-globina humana são PCO3: (5'ACACA ACTGTGTTCACTAGC'3) e PCO4: (5'CAACTTCATCCACGTTACC'3) (Life Technologies, São Paulo, Brasil). A técnica foi realizada segundo Saiki, et al, (1985) e amplifica 150pb.

Os produtos da PCR foram analisados por eletroforese sobre um gel de agarose à 2 % corados com brometo de etídio e observados em luz ultravioleta.

As análises moleculares foram realizadas no laboratório de biologia molecular da Fundação CECON e da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado onde os pesquisadores mantêm colaboração.

5.6.5 Detecção do DNA do HPV 16 por PCR em tempo Real

A detecção da infecção pelo HPV neste estudo se limitou a pesquisa da presença de DNA do HPV 16 realizado pela técnica de PCR em Tempo Real. A escolha foi feita em virtude da maior prevalência esperada para este genótipo do HPV e pela necessidade de otimização de recursos financeiro.

Para identificação do HPV 16 foi utilizado o protocolo segundo VEO et al. (2015), no qual as amostras foram submetidas ao ensaio de real-time PCR (qPCR) tipo específico, tendo como alvo a proteína E7 do HPV 16. Os ensaios de qPCR foram processados em sistema ABI 7300 de PCR em tempo real (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Os ensaios de real-time PCR (qPCR) para a proteína E7 do HPV 16 incluíram os seguintes primers de oligonucleotídeos: primer *forward* (5'GAT GAA ATA GAT GGT CCA GC3') e primer *reverse* (5'GCT TTG TAC GCA CAA CCG AAG C3'), e a sonda (5' FAM-CAA GCA GAA CCG GAC AG-MGB-NFQ) (Life Technologies, São Paulo, Brasil), de acordo com o protocolo seguinte:

Figura 2- qPCR HPV 16

Componentes	Vol.(μ l) 1 Reação	Concentração Final	
H2O	5		
TaqMan Master Mix 2x	12,5	1	X
P HPV 16 E7 (10 μ M)	1,0	0,4	μ M
P HPV 16 E7S (10 μ M)	1,0	0,4	μ M
Probe HPV 16 (10 μ M)	0,5	0,2	μ M
DNA	5		
Total	25		

As condições de amplificação foram de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 1 minuto e 60°C por 1 minuto. A reação de qPCR foi processada no equipamento ABI 7300, a cada corrida foram incluídos os seguintes componentes de controles: DNA de células SiLa como controle positivo e água como controle negativo; juntamente com as amostras em duplicata.

5.6.6 Imunohistoquímica para detecção da expressão da proteína P16

Esta análise foi realizada através de serviço terceirizado pelo Laboratório Hermes Pardini em São Paulo. Foram realizados cortes do material com espessura de 3 µm. A secção contendo tecido tumoral foi colocada em lâmina previamente silanizada. Os espécimes foram desparafinizados com xilol e re-hidratados em concentrações graduais de álcool e posteriormente lavadas em água destilada. Para recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em tampão citrato pH 6,0 sob pressão à temperatura de 121°C por 3 minutos (Pressure Cooker, Aptum Biologics - UK), e em seguida resfriadas à temperatura ambiente. Após lavagem em água deionizada, procedeu-se à neutralização da peroxidase endógena, incubando-se as lâminas em peróxido de hidrogênio 3% por 5 minutos. A seguir os espécimes foram lavados com tampão TrisSDS (TBS) por 5 minutos e seguiu-se com o bloqueio de proteínas, por 5 minutos. Após lavagem com TBS por 5 minutos, as lâminas foram então incubadas a 4°C overnight com o anticorpo primário monoclonal anti-p16 humano (clone E6H4, CINtec p16INK4a Histology Kit, Ventana Medical Systems, USA) diluição 1:5.

Após período de incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com TBS, incubadas com o anticorpo secundário (Post Primary, Novolink™ – Novocastra™) por 30 minutos e lavadas novamente por 5 minutos. Aplicou-se em seguida o polímero (Novolink™ Polymer - Novocastra™) e as lâminas foram incubadas novamente por 30 minutos, lavando-se com TBS por 5 minutos após esta etapa. Aplicação de reagente cromógeno DAB (3,3-diaminobenzidina) foi realizada por 5 minutos. Finalmente, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris (EasyPath®), e recobertas com lamínula e montadas utilizando-se meio de montagem (Entelan® - Merck Millipore).

Controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por PBS-BSA 1% e soro não imune de camundongo (X501-1; DAKO). Amostra de carcinoma de células escamosas de orofaringe conhecidamente positiva para expressão de p16 foi utilizada como controle positivo.

A expressão de p16 foi classificada como positiva na presença de coloração forte e difusa, tanto nuclear quanto citoplasmática. Qualquer outro padrão de coloração foi classificado como negativo. Todas as amostras foram classificadas independentemente por dois patologistas e em caso de discordância, as lâminas foram revisadas e um consenso para a classificação foi obtido.

O percentual de células marcadas foi determinado utilizando-se o H-Score (JORDAN et al., 2012). O H-score consiste em uma análise semiquantitativa obtida pelo produto da intensidade de marcação (avaliadas em uma escala de 0 a 3) e a porcentagem de células tumorais coradas em cada nível de intensidade (0 a 100%). Portanto, os valores para o H-Score variam de 0 a 300.

Jordan e colaboradores utilizaram a curva ROC para determinar sensibilidade e especificidade, chegando à conclusão de que, para a intensidade de marcação o escore 2 representou o de maior sensibilidade, e para a porcentagem de células marcadas, 35% foi a porcentagem mais específica para detecção de HPV de alto risco. Então foi escolhido o ponto de corte de 60 no H-Score, que representou uma sensibilidade de 91,6% e especificidade de 90,4% para a detecção, comparando com o padrão ouro para a detecção do HPV, que seria a expressão de E6 e E7. Portanto, este ponto de corte também foi utilizado em nosso estudo.

Cálculo utilizado para o H-Score:

$$\text{H-Score} = [1 \times (\% \text{ células intensidade } 1) + 2 \times (\% \text{ células intensidade } 2) + 3 \times (\% \text{ células intensidade } 3)]$$

Onde: 0 = ausência de marcação 1 = marcação de fraca intensidade 2 = marcação de intensidade moderada 3 = marcação de intensidade forte

5.6.7 Análise dos dados

Foi construído um banco de dados em planilha Excel e as análises estatísticas foram realizadas por meio do programa estatístico MINITAB versão 14.a. Primeiramente foi realizada a análise descritiva e exploratória dos dados e os

resultados foram apresentados em tabelas, figuras (gráficos), medidas descritivas de tendência central e de variabilidade (média, desvio-padrão – dp, mínimo e máximo) e por meio dos testes estatísticos para as comparações.

A comparação entre as idades por sexo foi realizada por meio do teste t-*Student* e para verificar as relações entre os grupos e as variáveis sexo, sítio anatômico e óbito utilizou-se o teste Qui-Quadrado de *Pearson*. Em todas as comparações foi considerado o nível de significância de 5% (nível de confiança igual a 95%).

5.7 Aspectos éticos

Este projeto foi analisado e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa em seres humanos (CEP) da FCECON, segundo resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

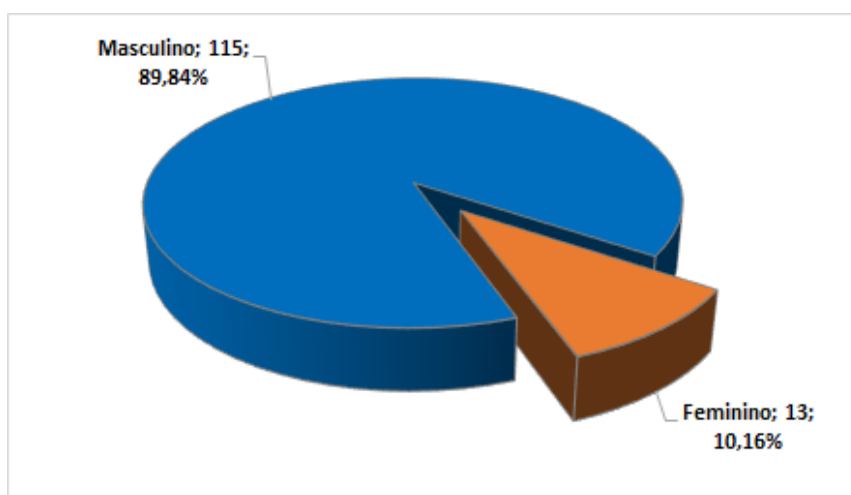
6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da Amostra Estudada

No período de Janeiro de 2009 a dezembro de 2013 foram cadastrados no serviço de radioterapia da FCECON 212 pacientes portadores de neoplasia de cavidade oral e orofaringe. Entre estes 212, foram localizados 128 prontuários que foram efetivamente analisados. Os demais foram considerados como perda (39,6%), uma vez que, após várias buscas, não foi possível a localização dos mesmos.

Dos 128 pacientes estudados, 115 (89,94%) eram do sexo masculino e 13 (10,16%) do sexo feminino (figura 3).

Figura 3 – Frequência por sexo dos pacientes avaliados



A idade dos pacientes variou entre 36 (mínima) e 91 (máxima), com média de idade de $60,77 \pm 11,93$ anos, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1 - Análise Descritiva da Idade dos pacientes estudados

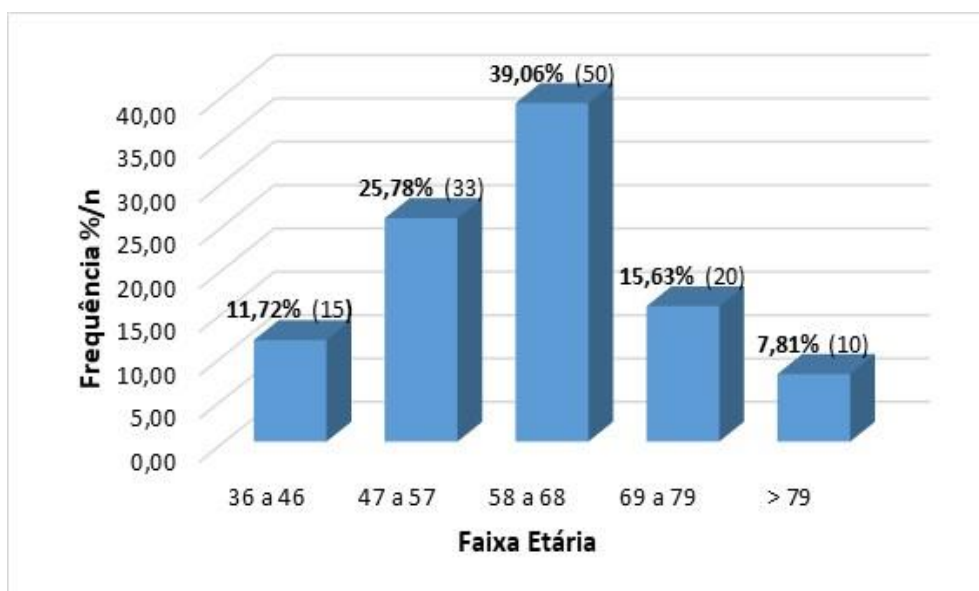
SEXO	n	MEDIDAS DESCRITIVAS				p *
		Média	dp	Mínimo	Máximo	
Masculino	113	59,64	11,12	36	86	0,003
Feminino	15	69,27	14,62	44	91	
Geral	128	60,77	11,93	36	91	

*Valores de p são significativos para $p < 0,05$ (5%)
teste t-Student

A idade dos pacientes de sexo masculino variou entre 36 (mínima) e 86 (máxima), com idade média de $59,64 \pm 11,12$ anos e dos pacientes de sexo feminino, e 44 (mínima) a 91 (máxima), com média de $69,27 \pm 14,62$ anos. Nesta amostra, a média da idade é significativa diferente entre os gêneros, caracterizando ainda que a média de idade dos pacientes de sexo feminino é significativamente maior do que a média da idade dos pacientes de sexo masculino ($p = 0,003$) (tabela 1).

Em relação à faixa etária, dos 128 pacientes, 15 (11,72%) estavam na faixa etária de 36 a 46 anos, 33 (25,78%) na faixa de 47 a 57, 50 (39,06%) na faixa de 58 a 68, 20 (15,63%) na faixa de 69 a 79 e 10 (7,81%) na faixa acima de 79 anos (figura 4).

Figura 4 – Frequência por faixa etária dos pacientes estudados



6.2 Características Clínicas, Tratamento e Desfecho dos Pacientes Estudados

Considerando o sítio anatômico, dos 128 pacientes, 46 (35,94%) apresentavam neoplasia de cavidade oral, enquanto que 82 (64,06%) apresentavam de orofaringe. O estágio mínimo dos pacientes avaliados foi T1N1 foi encontrado em 08 (6,30%) pacientes os demais sem exceção eram de lesões avançadas na sua maioria sendo T4 (44%). A maior frequência de pacientes estava no estadiamento T4N2 (22;17,32%), conforme tabela 2.

Tabela 2 – Características do diagnóstico dos pacientes estudados

CARACTERÍSTICAS	n*	%
Sítio Anatômico		
Cavidade Oral	46	35,94
Orofaringe	82	64,06
Estadiamento (n = 127)		
T1N1	8	6,30
T1N2	1	0,79
T2N0	6	4,72
T2N1	7	5,51
T2N2	9	7,09
T2N3	7	5,51
T3N0	4	3,15
T3N1	3	2,36
T3N2	13	10,24
T3N3	3	2,36
T3N4	1	0,79
T4N0	12	9,45
T4N1	8	6,30
T4N2	1	0,79
T4N2	22	17,32
T4N3	21	16,54
T8N2	1	0,79
Não informado: 1	-	-

* n = 128

Dos 128 pacientes estudados, foram encontradas as informações de tratamento de 120. Desses 120, 28 (23,73%) pacientes foram submetidos somente à radioterapia, 01 (0,85%) foi submetido somente à quimioterapia, 75 (65,56%) receberam ambos os tratamentos e 16 (13,56%) não chegaram a realizar nenhum tratamento (tabela 3).

Tabela 3 - Característica do tratamento administrado aos pacientes estudados

RADIOTERAPIA	QUIMIOTERAPIA				TOTAL
	Sim	%*	NÃO	%*	
Sim	75	63,56	28	23,73	103
Não	1	0,85	16	13,56	17
TOTAL	76	64,41	44	37,29	120

* Os percentuais estão calculados em relação ao total (120)

As dosagens do tratamento radioterápico foram administradas de acordo com o estadiamento da doença (tabela 4) e na quimioterapia os pacientes foram tratados com doses de Cisplatina que variaram de 30 a 90 mg².

Tabela 4 – Doses de radioterapia aplicadas

DOSE	n*	%
10CGY	1	0,98
48CGY	1	0,98
52CGY	1	0,98
56CGY	1	0,98
60CGY	1	0,98
64CGY	1	0,98
66CGY	1	0,98
70CGY	95	93,14
Não informado - 1	-	-

n* = 102

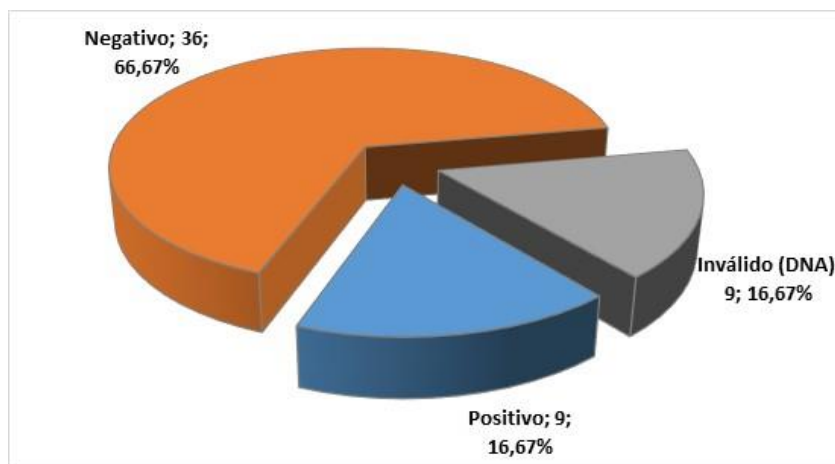
6.3 Detecção de HPV 16 por PCR em tempo real e Imunohistoquímica (P16)

Em relação a detecção do HPV 16 por PCR em tempo Real e Imunohistoquímica para pesquisa de P16 somente foram realizadas a pesquisas em 54 amostras. Isso se deve, principalmente, a falta de acesso aos blocos de parafina em laboratórios externos e também pela escassez de recursos financeiros que

inviabilizaram a realização das demais amostras tanto para o PCR quanto para Imunohistoquímica.

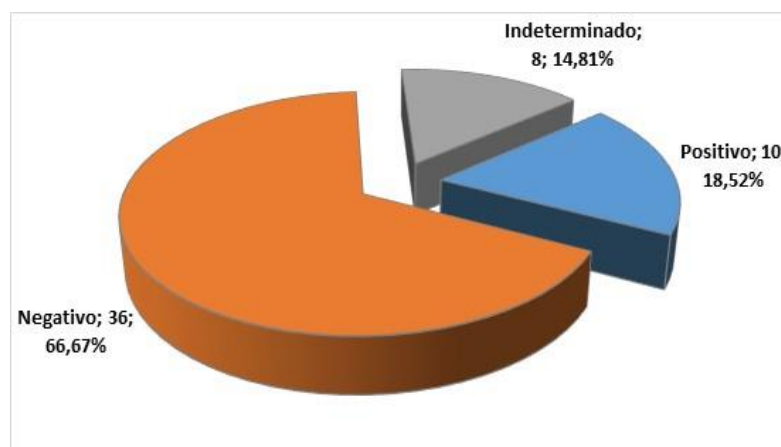
Quanto ao resultado obtido por meio do exame de PCR em tempo Real para HPV16, dos 54 pacientes 09 (16,67%) foram comprovadamente positivos, 36 (66,67%) negativos e por fim 09 (16,67%) foram inválidos (figura 6).

Figura 5 - Resultados para HPV por meio do PCR



Em relação ao exame de Imunohistoquímica para P16, 10 (18,52%) amostras foram positivas, 36 (66,67%) foram negativas e 08 (14,81%) indeterminadas (figura 7).

Figura 6 - Resultados para detecção da expressão da P16 por meio da Imunohistoquímica



Ao verificar a relação entre os resultados obtidos por meio da PCR em tempo real para detecção do HPV 16 e Imunohistoquímica, verificou-se que não há

evidências de que ambos estejam relacionados ($p = 0,383$), conforme apresentado na tabela 5. Observou-se ainda que não houve concordância significativa entre os resultados desses exames ($kappa = 0$). Dos 54 pacientes submetidos a PCR e Imunohistoquímica (P16), 03 (5,56%) foram positivos em ambos os exames (tabela 5).

Tabela 5 – Relação entre os resultados do PCR e Imunohistoquímica

PCR	IMUNOHISTOQUÍMICA (P16)						TOTAL
	Positivo	%*	Negativo	%*	Indeterm.	%*	
Positivo	3	5,56	4	7,41	2	1,69	9
Negativo	5	9,26	25	46,30	6	5,08	36
Inválido	2	3,70	7	12,96	0	0,00	9
TOTAL	10	18,52	36	66,67	8	14,81	54

* Os percentuais estão calculados em relação ao total (54)

$p = 0,383$ (teste Qui-Quadrado de *Pearson*)

Valores de p são significativos para $p < 0,05$ (5%)

Em relação aos resultados da PCR em tempo real (HPV16), dos 09 pacientes com resultado positivo, 08 (80,0%) eram do sexo masculino e 01 (20,0%) era do sexo feminino. Quanto ao sítio anatômico, 03 (33,33%) eram de cavidade oral e 06 (66,67%) e desses 09 pacientes que apresentaram resultado positivo, 06 (66,67%) vieram ao óbito (tabela 6).

Tabela 6 - Relação entre o sexo, sítio anatômico e óbito e os resultados da PCR em tempo real para HPV16

VARIÁVEL	PCR (HPV16)						TOTAL	p
	Positivo	%*	Negativo	%*	Indeterm.	%*		
Sexo								
Masculino	8	80,00	34	94,44	6	75,00	48	0,060
Feminino	1	10,00	2	5,56	3	37,50	6	
TOTAL	9	90,00	36	100,00	9	112,50	54	
Sítio Antômico								
Cavidade Oral	3	33,33	13	36,11	4	44,44	20	0,870
Orofaringe	6	66,67	23	63,89	5	55,56	34	
TOTAL	9	100,00	36	100,00	9	100,00	54	
Óbito								
Sim	6	66,67	11	35,48	5	71,43	22	0,094
Não	3	33,33	20	64,52	2	28,57	25	
TOTAL	9	100,00	31	100,00	7	100,00	47	

* Os percentuais estão calculados em relação ao total

Valores de p são significativos para $p < 0,05$ (5%)

teste Qui-Quadrado de *Pearson*

Em relação aos resultados da Imunohistoquímica (P16), dos 10 pacientes com resultado positivo, 08 (80,0%) eram do sexo masculino e 02 (20,0%) era do sexo feminino. Quanto ao sítio anatômico, 03 (30,00%) eram de cavidade oral e 07 (70,00%) e desses 10 pacientes que apresentaram resultado positivo, 06 (66,67%) vieram ao óbito (tabela 7).

Tabela 7 - Relação entre o sexo, sítio anatômico e óbito e os resultados da Imunohistoquímica (P16)

VARIÁVEL	IMUNOHISTOQUÍMICA (P16)						TOTAL	p
	Positivo	%*	Negativo	%*	Indeterm.	%*		
Sexo								
Masculino	8	80,00	33	91,67	7	87,50	48	0,060
Feminino	2	20,00	3	8,33	1	12,50	6	
TOTAL	10	100,00	36	100,00	8	100,00	54	
Sítio Antômico								
Cavidade Oral	3	30,00	14	38,89	3	37,50	20	0,422
Orofaringe	7	70,00	22	0,00	5	62,50	34	
TOTAL	10	100,00	36	38,89	8	100,00	54	
Óbito								
Sim	5	55,56	14	45,16	3	50,00	22	0,810
Não	4	44,44	18	58,06	3	50,00	25	
TOTAL	9	100,00	31	65,96	6	100,00	47	

* Os percentuais estão calculados em relação ao total por coluna

Valores de p são significativos para $p < 0,05$ (5%) teste Qui-Quadrado de *Pearson*

Dos 54 pacientes que foram avaliados para pesquisa de PCR em tempo real para HPV16 e expressão da proteína P16 somente 25 foram encontrados com algum registro de seguimento, com uma mediana de seguimento de 2,8 anos.

Quinze (60%) destes pacientes vieram a óbito por persistência da doença, todos eram do grupo HPV16 negativo/P16 negativo, 10(66%) pacientes eram de orofaringe e 5 (33%), de cavidade oral, todos tinham estágio avançado com 10 (66%) sendo T4N2 e 5 (33%) T4N3.

Cinco pacientes faleceram após 2 anos da terapia por causa da doença, 4 apresentavam lesão de orofaringe e 1 de cavidade oral, todos também eram de estágio avançado 3 T3N2, 2 T3N3, 3 (60%) eram HPV16 negativo/P16negativo e 2(40%) HPV16 negativo/ P16 positivo.

Por fim 5 estavam vivos sem evidencia de doença, todos eram portadores de lesão de orofaringe, 2 eram T2N0, 2 eram T2N2 e 1 T4N0. O status HPV 16 positivo/P16 positivo foram 3, 1 HPV 16 positivo/P16 negativo e 1 HPV 16 negativo/P16 negativo (tabela 8).

Tabela 8 - Seguimento de alguns pacientes estudados (n = 25)

CARACTERÍSTICAS	Seguimento 1 ^A		Seguimento 2 ^B (após 2 anos)		VIVOS	
	n	%	n	%	n	%
Óbito	(n = 25)		(n = 10)		(n = 05)	
Sim	15	60,0	5	50,0	-	-
Não	10	40,0	5	50,0	-	-
Grupo^C	(n = 15)		(n = 05)		(n = 05)	
Positivo - Positivo	-	-	-	-	3	60,0
Positivo-Negativo	-	-	-	-	1	20,0
Negativo-Positivo	-	-	2	40,0	-	-
Negativo-Negativo	15	100,0	3	60,0	1	20,0
Sítio Anatômico	(n = 15)		(n = 05)		(n = 05)	
Cavidade oral	5	33,3	1	20,0	0	0,0
Orofaringe	10	66,7	4	80,0	5	100,0
Estadiamento	(n = 15)		(n = 05)		(n = 05)	
T2N0	-	-	-	-	2	40,0
T2N2	-	-	-	-	2	40,0
T3N2	-	-	3	60,0	-	-
T3N3	-	-	2	40,0	-	-
T4N0	-	-	-	-	1	-
T4N2	10	66,7	-	-	-	-
T4N3	5	33,3	-	-	-	-

^A Seguimento 1: tempo do início do tratamento até dois anos de seguimento

^B Seguimento 2: tempo do início do tratamento após 2 anos de seguimento

^C Grupo: Relação HPV 16/ P16

7 DISCUSSÃO

Avaliar a presença de marcadores da infecção pelo HPV dos pacientes com neoplasia de orofaringe e cavidade oral em um serviço de oncologia permite que se tenha visão mais adequada do prognóstico da doença e explorar como cada paciente se apresenta não só em relação ao status do HPV mas também em relação a outras características da neoplasia, permite uma nova programação do tratamento radioterápico e direcionar ações tanto de prevenção como de tratamento.

Este estudo mostrou o gênero masculino como o mais afetado (78,5%) com as neoplasias de cavidade oral e orofaringe, conforme a literatura (LOW et al ,2016; DSOUZA et al 2016; HUSAIN et al 2017).

A faixa etária mais acometida no atual estudo foi entre 60-69 anos (32,3%) também bem compatível com o encontrado em diversos estudos. Chama-se atenção somente ao elevado número de casos entre pacientes entre 40-50 anos acometendo 31% dos casos (DSOUZA et al 2016; ANDREWS et al ,2008).

O sitio anatômico mais prevalente foi o de orofaringe (63%), tendo o palato mole (21%) e base de língua (31%) como os principais locais. Esta distribuição é esperada pois realmente as lesões de orofaringe são as que mais cursam com a prevalência do HPV como agente causador (GIULIANO et al, 2010; DSOUZA et al 2016).

Quanto ao tipo histológico, na sua maioria das lesões eram carcinomas epidermóides (95%) em grande parte bem diferenciados (42%) e moderadamente diferenciados (38%) e o restante (20%) pouco diferenciados. Interessante observar a alta prevalência desse tipo histológico e em sua maioria ser de bem diferenciados mesmo com o uso excessivo de agentes causadores como o tabaco e álcool que estão relacionados com uma pior diferenciação (BEST, et al 2012).

A dose utilizada no tratamento radioterápico é dependente da adesão ao tratamento proposto. Neste estudo 94% dos pacientes completaram o tratamento com dose total de 70Gy, o que mostra um resultado surpreendente pois comprova uma alta adesão ao tratamento mesmo com todos os efeitos colaterais inerentes ao mesmo como mucosites e dermatites.

Em relação a quimioterapia 65% receberam em algum momento alguma dose de quimioterápico, o que mostra uma cobertura compatível com a literatura que prevê

que, mesmo debilitados pela doença, a grande maioria consegue ainda fazer o tratamento proposto (HAUGHEY et al,2016).

Em relação aos pacientes com PCR (HPV16) positivo que é o padrão ouro para a pesquisa do HPV, o resultado mostrou um valor bem maior (16,6%) que a média brasileira que está em torno de 5-10% em pacientes com neoplasia de cabeça e pescoço ligados ao HPV (PYTINIA et al,2014), porém bem menos prevalente que em países desenvolvidos (em torno de 40% - 60%) (Zhang, 2016; Hoffman, 2016). Esse resultado certamente seria ainda maior uma vez que no atual estudo foi realizada apenas a pesquisa do genótipo mais envolvido com a lesão (HPV 16), sendo ainda necessária a realização da PCR para os demais genótipos do HPV. E ainda pode ser maior considerando a perda de informação por resultados inválidos na PCR.

Em relação ao exame ser negativo para a presença do HPV 16, os altos valores refletem-se no diagnóstico tardio e estadiamento avançado da doença (CHRISTIAENS et al,2016). Este fato se deve, muito provavelmente por efeito do uso prolongado do álcool e fumo, que infelizmente, a grande maioria dos prontuários não apresentavam informações, e nos coloca em alerta da necessidade do diagnóstico precoce, com exames de rastreio e campanhas de conscientização que possam atingir a população em grande parte sem acesso a saúde.

Resultados parecidos foram encontrados na pesquisa da expressão da P16 onde somente 18,52% dos pacientes apresentaram amostras positivas e sua maioria negativos (66,67%) dados esses levemente elevados em relação à média brasileira, porém compatíveis com o esperado. Da mesma forma que a positividade para HPV16 por PCR a imunohistoquímica acompanha normalmente os resultados, refletindo em menores números em países em desenvolvimento e aumentado nos países desenvolvidos (Hoffman , 2016). Por ser um exame mais sensível às condições de armazenamento das peças anatômicas, é bem provável que fossem encontrados mais resultados positivos caso as condições melhores tanto na coleta e fixação quanto na armazenagem.

Em relação ao sítio anatômico observou-se uma maior prevalência de positividade tanto para o HPV16 (66%) quanto o P16 (70%) para o sítio de orofaringe. Tanto Chena e colaboradores (2018) quanto D´Souza (2016) demonstraram uma inversão com a maioria dos pacientes, sendo de neoplasia de cavidade oral normalmente apresentado a maioria dos casos de neoplasia de cabeça e pescoço causados por HPV.

Esses dois resultados (PCR HPV16 e expressão da p16) se refletiram na formação dos grupos, onde 46,3% atestaram ser negativos tanto para o PCR (HPV16) quanto para a imunohistoquímica (P16) que mostram baixas taxas em relação aos países em desenvolvimento e do hemisfério norte principalmente em países nórdicos que quase 100% da população com neoplasia de cabeça e pescoço apresentam HPV16 + e P16 + (LOW et al, 2015). Pacientes que foram HPV16 + e P16 + somaram 3 pacientes apenas demonstrando os resultados esperados para a população da América do Sul (Benson et al, 2016).

Com os resultados de um alto número de pacientes HPV negativos refletiu-se na resposta terapêutica onde dos 25 pacientes seguidos, 15 (60%) faleceram com persistência de doença e que eram do grupo negativo (HPV16) /negativo (P16), 5 faleceram acerca de 2 anos do tratamento e que também eram de grupos negativo (HPV16) / negativos (P16) e negativo (HPV16) / positivos (P16). Por outro lado, aqueles que se apresentaram vivos até a data avaliada em sua maioria pertenciam ao grupo positivo (HPV16) /positivo (P16) (60%) e 1 positivo (HPV16) /negativo (P16) (20%). Há de se lembrar que a maioria dos pacientes foram diagnosticados com estágio avançado, muitos tiveram seus tratamentos atrasado por diversos fatores como: falta de exames de estadiamento, espera por tratamento dentário, espera em fila para radioterapia e quimioterapia, falta de medicação e quebra de equipamentos. Isso tudo influenciando a resposta ao tratamento, demonstrando que não somente ofertar tratamento pode melhorar o prognóstico mas também outros fatores estão ligados ao prognóstico dos pacientes, apesar de ter sido possível a obtenção de dados de seguimento de somente 25 pacientes, pôde-se observar que os que se encontravam vivos eram os positivos tanto do HPV16 quanto do P16 e os que vieram a óbito eram do grupo negativo(HPV16) - negativo(P16). Estes dados estão de acordo com os achados de diversos estudos que demonstraram a melhora do prognostico dos pacientes quando HPV positivo (LOW et al ,2016).

Importante levar em conta as limitações deste estudo considerando as dificuldades enfrentadas na coleta do material, onde muitas vezes não foram armazenados ou fixados de maneira adequada. Este fato tem impacto, pois diminui a qualidade do DNA e da análise imunohistoquímica aumentando os resultados falso negativos ou inválidos/indeterminados.

Apesar de todas as dificuldades encontradas como: prontuários perdidos, prontuários sem informações, dificuldades de localização das peças anatômicas,

armazenamento de peças anatômicas inadequadas e falta de recursos para a realização das análises moleculares e de imunohistoquímica, foi possível realizar a análise de como se encontra o status da infecção pelo HPV na população de pacientes atingidos pela neoplasias de orofaringe e cavidade oral tratados nos serviços de radioterapia e quimioterapia da FCECON que, por centro de referência em oncologia no estado, representa o perfil do paciente oncológico de todo o Amazonas.

8 CONCLUSÕES

Os pacientes com neoplasia de cavidade oral e orofaringe atendidos no centro de referência em oncologia no estado do Amazonas (FCECON) são na maioria homens e com média de idade de 60,77 anos.

A ocorrência de tumores avançados com estadiamento alto ainda é maioria entre os pacientes atendidos. O estágio mínimo dos pacientes avaliados foi T1N1 foi encontrado em 08 (6,30%) pacientes os demais sem exceção eram de lesões avançadas na sua maioria sendo T4 (44%).

Pacientes com estadiamento inicial e que completaram o tratamento tiveram uma melhor resposta e melhor prognóstico, sendo a maioria deles (HPV16positivo/P16 positivo).

A frequência do HPV 16 entre os pacientes estudados foi de 16,67%.

A frequência da expressão da proteína p16 foi de 18,52%.

O uso rotineiro da pesquisa de P16 por imunohistoquímica e a pesquisa do HPV na lesão em todos os pacientes com o diagnóstico de neoplasia de cavidade oral e orofaringe deve ser implantado, tendo em vista que há mudanças de estadiamento destas neoplasias quando positivas para HPV e melhora da resposta terapêutica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, Karen S. et al. HPV16 antibodies as risk factors for oropharyngeal cancer and their association with tumor HPV and smoking status. **Oral oncology**, v. 51, n. 7, p. 662-667, 2015.

ANDREWS, Elizabeth; SEAMAN, William T.; WEBSTER-CYRIAQUE, Jennifer. Oropharyngeal carcinoma in non-smokers and non-drinkers: a role for HPV. **Oral oncology**, v. 45, n. 6, p. 486-491, 2009.

BENSON, Eleni et al. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. **Oral oncology**, v. 50, n. 6, p. 565-574, 2014.

BIESAGA, Beata et al. HPV16 detection by qPCR method in relation to quantity and quality of DNA extracted from archival formalin fixed and paraffin embedded head and neck cancer tissues by three commercially available kits. **Journal of virological methods**, v. 236, p. 157-163, 2016.

BLITZER, Grace C. et al. Review of the clinical and biologic aspects of human papillomavirus-positive squamous cell carcinomas of the head and neck. *International Journal of Radiation Oncology• Biology• Physics*, v. 88, n. 4, p. 761-770, 2014.

CHEN, Xiaohang et al. Immunological network analysis in HPV associated head and neck squamous cancer and implications for disease prognosis. **Molecular immunology**, v. 96, p. 28-36, 2018.

CHRISTIAENS, Melissa et al. Quality assurance of radiotherapy in the ongoing EORTC 1219-DAHANCA-29 trial for HPV/p16 negative squamous cell carcinoma of the head and neck: Results of the benchmark case procedure. **Radiotherapy and Oncology**, v. 123, n. 3, p. 424-430, 2017.

D'SOUZA, Gypsyamber et al. Effect of HPV on head and neck cancer patient survival, by region and tumor site: A comparison of 1362 cases across three continents. **Oral oncology**, v. 62, p. 20-27, 2016.

DAHLSTROM, Kristina R. et al. Socioeconomic characteristics of patients with oropharyngeal carcinoma according to tumor HPV status, patient smoking status, and sexual behavior. **Oral oncology**, v. 51, n. 9, p. 832-838, 2015.

DOORBAR, John et al. Human papillomavirus molecular biology and disease association. **Reviews in medical virology**, v. 25, n. S1, p. 2-23, 2015.

FONMARTY, D. et al. Study of the concordance between p16 immunohistochemistry and HPV-PCR genotyping for the viral diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. **European annals of otorhinolaryngology, head and neck diseases**, v. 132, n. 3, p. 135-139, 2015.

GEIGER, Jessica L. et al. Adjuvant chemoradiation therapy with high-dose versus weekly cisplatin for resected, locally-advanced HPV/p16-positive and negative head and neck squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, v. 50, n. 4, p. 311-318, 2014.

HAUGHEY, B. H. et al. Pathology-based staging for HPV-positive squamous carcinoma of the oropharynx. **Oral oncology**, v. 62, p. 11-19, 2016.

HOFFMANN, Markus et al. HPV DNA, E6* I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer—How valid is p16INK4A as surrogate marker? **Cancer letters**, v. 323, n. 1, p. 88-96, 2012.

HONG, Angela et al. Relationships between p53 mutation, HPV status and outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Radiotherapy and Oncology**, v. 118, n. 2, p. 342-349, 2016.

HUANG, Shao Hui et al. Natural course of distant metastases following radiotherapy or chemoradiotherapy in HPV-related oropharyngeal cancer. **Oral oncology**, v. 49, n. 1, p. 79-85, 2013.

HUSAIN, Nuzhat; NEYAZ, Azfar. Human papillomavirus associated head and neck squamous cell carcinoma: Controversies and new concepts. **Journal of oral biology and craniofacial research**, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Incidência de câncer 2016. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em: 03/06/2018

KACZMAR, John M. et al. HPV-related oropharyngeal cancer: Risk factors for treatment failure in patients managed with primary transoral robotic surgery. **Head & neck**, v. 38, n. 1, p. 59-65, 2016.

KIMPLE, Randall J.; HARARI, Paul M. Is radiation dose reduction the right answer for HPV-positive head and neck cancer?. **Oral oncology**, v. 50, n. 6, p. 560-564, 2014.

KUHS, Krystle A. Lang et al. Characterization of human papillomavirus antibodies in individuals with head and neck cancer. **Cancer epidemiology**, v. 42, p. 46-52, 2016.

LIU, Sandy Z. et al. Correlation of p16 expression and HPV type with survival in oropharyngeal squamous cell cancer. **Oral oncology**, v. 51, n. 9, p. 862-869, 2015.

LOW, Garren M. et al. The effect of human papillomavirus on DNA repair in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, v. 61, p. 27-30, 2016.

MARCU, Loredana G. Future treatment directions for HPV-associated head and neck cancer based on radiobiological rationale and current clinical evidence. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 103, p. 27-36, 2016.

MARSZAŁEK, Andrzej; SZYLBERG, Łukasz. HPV-Related Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. In: **HPV Infection in Head and Neck Cancer**. Springer, Cham, 2017. p. 89-100.

MARUR, Shanthy et al. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. **The lancet oncology**, v. 11, n. 8, p. 781-789, 2010.

MIRGHANI, Haïtham et al. Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancers: Molecular basis and therapeutic perspectives. **Cancer treatment reviews**, v. 41, n. 10, p. 844-852, 2015.

MORBINI, Patrizia et al. Exfoliated cells of the oral mucosa for HPV typing by SPF10 in head and neck cancer. **Journal of virological methods**, v. 186, n. 1-2, p. 99-103, 2012.

OU, Dan et al. Prognostic value of tissue necrosis, hypoxia-related markers and correlation with HPV status in head and neck cancer patients treated with bio-or chemo-radiotherapy. **Radiotherapy and Oncology**, v. 126, n. 1, p. 116-124, 2018.

PANWAR, Aru et al. Human papilloma virus positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: a growing epidemic. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 2, p. 215-219, 2014.

PYTYNIA, Kristen B.; DAHLSTROM, Kristina R.; STURGIS, Erich M. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. **Oral oncology**, v. 50, n. 5, p. 380-386, 2014.

RAMPIAS, Theodoros; SASAKI, Clarence; PSYRRI, Amanda. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. **Oral oncology**, v. 50, n. 5, p. 356-363, 2014.

SAIKI, Randall K. et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SOLOMON, Benjamin; YOUNG, Richard J.; RISCHIN, Danny. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. In: **Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2018.

SØRENSEN, Brita Singers et al. Radiosensitivity and effect of hypoxia in HPV positive head and neck cancer cells. **Radiotherapy and oncology**, v. 108, n. 3, p. 500-505, 2013.

ST GUILY, Jean Lacau et al. Oropharyngeal cancer prognosis by tumour HPV status in France: The multicentric Papillophar study. **Oral oncology**, v. 67, p. 29-36, 2017.

TANAKA, Takako Imai; ALAWI, Faizan. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **Dental Clinics**, v. 62, n. 1, p. 111-120, 2018.

TRIBIUS, Silke et al. Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: what we know and what we need to know. **Cancer letters**, v. 304, n. 2, p. 71-79, 2011.

VEO, Carlos AR et al. Clinical characteristics of women diagnosed with carcinoma who tested positive for cervical and anal high-risk human papillomavirus DNA and E6 RNA. **Tumor Biology**, v. 36, n. 7, p. 5399-5405, 2015.

VOKES, Everett E.; AGRAWAL, Nishant; SEIWERT, Tanguy Y. HPV-associated head and neck cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 107, n. 12, p. djv344, 2015.

YOUNG, David et al. Increase in head and neck cancer in younger patients due to human papillomavirus (HPV). **Oral oncology**, v. 51, n. 8, p. 727-730, 2015.

ZHANG, Yuehan et al. Human papillomavirus (HPV) 16 antibodies at diagnosis of HPV-related oropharyngeal cancer and antibody trajectories after treatment. **Oral oncology**, v. 67, p. 77-82, 2017.

ANEXO 1

FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS

SAME: _____

Idade: _____ Sexo: _____

Diagnóstico: Orofaringe Cavidade oral Status HPV: Positivo Negativo

Status P16: _____

Radioterapia: Sim Não

Dose Radioterapia: _____

Quimioterapia: Sim Não

Quimioterápico e dose: _____

Período de tratamento: _____

Bloco de parafina: _____

Laboratório de patologia: _____

Recidiva local: Sim Não Recidiva Regional: Sim Não Metástases a distância: Sim Não Óbito: Sim Não

Data óbito: _____

Cirurgia: Sim Não