



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS**

MARIZELI VIANA DE ARAGÃO ARAÚJO

**CORRELAÇÃO ENTRE O CÂNCER BUCAL E DE LARINGE E A PRESENÇA DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) NO
ESTADO DO PARÁ**

**BELÉM
2013**

MARIZELI VIANA DE ARAGÃO ARAÚJO

**CORRELAÇÃO ENTRE O CÂNCER BUCAL E DE LARINGE E A PRESENÇA DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) NO
ESTADO DO PARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Doutor em Doenças Tropicais. Área de concentração: Patologia em Doenças Tropicais.

Orientadora: Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros Sousa.

Co-orientadora: Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii

**BELÉM
2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFPA

Araújo, Marizeli Viana de Aragão, 1963-
Correlação entre o câncer bucal e de laringe
e a presença do Papilomavírus humano (HPV) e do
vírus Epstein-barr (EBV) no Estado do Pará /
Marizeli Viana de Aragão Araújo. - 2013.

Orientadora: Rita Catarina Medeiros Sousa;
Coorientadora: Hellen Thais Fuzii.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do
Pará, Núcleo de Medicina Tropical, Programa de
Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Belém, 2013.

1. Câncer. 2. Epidemiologia. 3.
Papilomavírus. I. Título.

CDD 22. ed. 616.99466



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS TROPICAIS

MARIZELI VIANA DE ARAGÃO ARAÚJO

**CORRELAÇÃO ENTRE O CÂNCER BUCAL E DE LARINGE E A PRESENÇA DO
PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) E DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV) NO
ESTADO DO PARÁ**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Doenças Tropicais do
Núcleo de Medicina Tropical/UFPA.

Aprovado em: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof^a. Dr^a. Rita Catarina Medeiros Sousa
Orientadora – NMT/UFPA

Prof. Dr. Juarez Antônio Simões Quaresma
Membro - NMT/UFPA

Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro
Membro - ICS/UFPA

Prof^a. Dr^a. Regina Fátima Feio Barroso
Membro - ICS/UFPA

Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano
Membro - ICB/UFPA

Prof^a. Dr^a. Fabiola Elizabeth Villanova
Membro suplente - NMT/UFPA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Zilomar (*in memoriam*) e Maria José, que nunca pouparam esforços para me educar e sempre me incentivaram em todos os momentos de minha vida.

Ao meu querido esposo, Izamir, pela constante motivação, amor, carinho, amizade e meu principal incentivador para a realização do doutorado.

AGRADECIMENTOS

Os últimos cinco anos representaram uma fase de mudança na minha vida. A opção de fazer doutorado em Doenças Tropicais exigiu a busca de novos conhecimentos em uma área desconhecida. Aos poucos foi preciso substituir a utilização dos conhecidos instrumentais (Hollenback, espátulas de inserção, curetas de Gracey entre outros) e materiais dentários por pipetas, *primers*, centrífugas, termocicladores. Deixar de realizar procedimentos odontológicos rotineiros como restaurações, raspagens, profilaxias, me afastar da docência temporariamente e aprender como fazer extração de DNA e PCR entre outros procedimentos foi desafiador.

Neste percurso muitas coisas aconteceram e agradecer a todos que participaram comigo desse processo é essencial. Fiz grandes amigos. Espero não me esquecer de alguém.

A Deus, por guiar meus passos e sempre me proteger em todos os momentos de minha vida. “O Senhor é meu pastor, nada me faltará. Em verdes prados ele me faz repousar. Conduz-me junto às águas refrescantes. Restaura as forças de minha alma”.

A Nossa Sra. de Nazaré por sua proteção constante.

A minha família: meus pais Zilomar e Maria José, meu marido Izamir, meu irmão Ismael, minha cunhada Andréa e minhas sobrinhas Ana Gisele, Giovana e Giulia. Sempre considerei a família como prioridade na vida. Ela também se modificou neste período, meu pai se foi e para superar a tristeza, chegaram minhas sobrinhas para alegrar a família. Muito obrigada a todos por entenderem meus momentos de ausência neste período. Amo vocês.

A Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros Souza que foi a primeira pessoa que tive contato nesse novo percurso, confiou em mim sem reservas, aceitando ser minha orientadora, mesmo sem me conhecer. Meu muito obrigada por sua confiança, carinho, apoio e compreensão em todo o decorrer da tese.

Ao Prof. Dr. Juarez Antonio Simões Quaresma, que foi a segunda pessoa que conheci no NMT. Ao permitir a realização da pesquisa no Laboratório de Imunopatologia, possibilitou minha inserção em uma equipe multiprofissional, que se tornou uma família para todos que lá trabalham. Muito obrigada pelo apoio, amizade e as longas conversas, passando pela ciência, política, religião até o comportamento

humano. Que Deus lhe proteja nessa jornada de Reitor da UEPA que agora se inicia.

A Profa. Dra. Hellen Thais Fuzii, minha co-orientadora, que foi essencial na realização desse trabalho. Sem sua orientação ele não seria possível. Obrigada por tudo que me ensinou, desde pipetar até a realizar PCR em tempo real, entre outras coisas. Sua confiança em que tudo ia dar certo, mesmo quando dava tudo errado era esperançoso. Obrigada pela amizade, carinho, conforto nos momentos difíceis e por nos alegrar quando preciso.

Ao Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro, pela sua contribuição ao longo da execução da tese. Suas sugestões desde o processo de consultoria, qualificação até a defesa foram muito importantes e enriqueceram este trabalho.

A Profa. Dra. Regina Fátima Feio Barroso, companheira da Saúde Coletiva e muitas lutas, que me indicou a Profa. Rita e incentivou a fazer este doutorado.

Aos amigos Tinara Aarão, Denise Pinto e George Dias meu agradecimento especial. Juntos formamos uma família, não só científica, como costumamos dizer, mas uma família em todos os sentidos, com um sempre disposto a ajudar o outro, quer nos momentos de estresses ou para resolver uma missão quase impossível, como padronizar uma citocina, padronizar e tipar o EBV (no meu caso), com a Tinara encabeçando a trilha sonora do Indiana Jones. Nossa Sra. de Nazaré também se tornou nossa Padroeira no laboratório, com direito a cesto de pedido com fitas e microtubos e peregrinação pelo laboratório. Quando a situação estava difícil e a ciência não ajudava, falávamos: “vamos pedir pra Santinha”. Muito obrigada a vocês, pelos momentos de alegria. Espero que continuemos a produzir nos congressos e claro, ganhando prêmios também.

A Lienne Moraes, Juliana Aguiar, Nélida Silva, Rodrigo Barros, Luis Paulo Soares e Edvaldo Penha que me ajudaram durante a realização das técnicas laboratoriais.

A Dra. Fabíola Villanova que me ajudou na padronização do EBV.

Ao afilhado amigo Helder Henrique Costa Pinheiro, responsável pela execução da estatística deste trabalho. Estivemos juntos em vários momentos de nossa vida, desde sua graduação em Odontologia, quando fui sua professora, e agora somos colegas de disciplina. Obrigada pela sua amizade.

As queridas afilhadas Priscilla Gonçalves e Regiane Carvalho que ao realizarem seu TCC coletaram os dados epidemiológicos deste trabalho.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina Tropical pela cordialidade e amizade sempre presente, em especial a Marluce, Sr. Ademir, Valdenira e Socorro Cardoso.

Aos professores do Núcleo de Medicina Tropical pelos conhecimentos transmitidos ao longo do doutorado.

Aos participantes da pesquisa, que aceitaram participar do estudo, possibilitando maior conhecimento dos agentes virais com o câncer bucal.

Ao Hospital Ophir Loyola que possibilitou a realização do estudo.

Ao CNPq, FAPESPA e Eletronorte pelo apoio financeiro para desenvolvimento do projeto.

Nunca Pare de Sonhar

“Ontem um menino que brincava me falou
Hoje é a semente do amanhã
Para não ter medo que este tempo vai passar
Não se desespere, nem pare de sonhar
Nunca se entregue, nasça sempre com as
manhãs
Deixe a luz do sol brilhar no céu do seu olhar
Fé na vida, fé no homem, fé no que virá
Nós podemos tudo, nós podemos mais
Vamos lá fazer o que será”.

Gonzaguinha

RESUMO

O câncer bucal e de laringe representam um problema crescente de saúde pública no Brasil. O tabagismo e o álcool são considerados os principais causadores do câncer bucal e de laringe, porém uma parte da população desenvolve a doença sem estar exposta a estes fatores de risco, sugerindo a existência de outras causas como: predisposição genética, alteração de genes supressores tumorais, dieta e agentes virais, em particular o *Papilomavírus humano* (HPV) e o vírus Epstein-Barr (EBV). Este estudo teve como proposição verificar a prevalência do HPV e do EBV na mucosa oral normal e no câncer bucal e de laringe, e quais os tipos mais prevalentes nestas duas situações. Para este estudo foram estabelecidos dois grupos: um composto por 70 espécimes emblocados em parafina, com diagnóstico confirmado de câncer bucal e laringe e outro com 166 indivíduos sem presença de lesões na cavidade bucal. A análise laboratorial para detecção viral do HPV e a detecção e tipagem do EBV (EBV 1 ou tipo 2) foram realizadas através da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) convencional. Já as tipagens das amostras positivas para o HPV (tipos 6, 11, 16, 18, 33, 35, 38, 52 e 58) foram realizadas por PCR em tempo real, utilizando sondas específicas para cada tipo. A prevalência do HPV e EBV encontrada nas neoplasias orais e de laringe foi de 78,6% para HPV e de 84,3% para EBV e de 24,1% e 45,8% para HPV e EBV, respectivamente, em indivíduos sem lesões orais. Os tipos mais prevalentes de HPV foram HPV 58 (50,9%), HPV 6 (9,1%) e HPV 16 (9,1%) nas neoplasias e HPV 18 (12,5%), HPV 6 (7,5%) e HPV 58 (2,5%) no grupo com ausência de lesões. O EBV 2 foi mais prevalente tanto nas lesões neoplásicas quanto nos indivíduos sem lesões, com frequência de 94,9% e 82,9%, respectivamente. Não houve associação da infecção por HPV e EBV com o sexo, sendo a prevalência semelhante para homens e mulheres. Foi observada associação entre as prevalências de HPV e EBV e suas co-infecções com o grupo que desenvolveu câncer. A prevalência de infecção por HPV e EBV e a razão de chances na ocorrência do câncer foi de 8,86 ($p < 0,0001$) nos indivíduos infectados pelo HPV e de 4,08 ($p = 0,0004$) nos infectados pelo EBV. O valor probabilístico estimado para prevalência de HPV e EBV e co-infecção e a ocorrência de câncer, demonstrou que o indivíduo infectado pelos dois vírus tem 65,72% de probabilidade de desenvolver câncer, enquanto o infectado pelo HPV tem 31,94% e o infectado pelo EBV 17,79%. Os resultados encontrados neste estudo permitem sugerir que os agentes virais (HPV e EBV) são fatores de risco importantes para o desenvolvimento da carcinogênese, sendo o HPV mais efetivo que o EBV no desencadeamento da doença.

Palavras chaves: Epidemiologia, *Papilomavírus humano*, vírus Epstein-Barr, câncer.

ABSTRACT

The oral and laryngeal cancer represents a growing public health problem in Brazil. Smoking and alcohol are the main causes of oral cancer and larynx, but a part of the population develops the disease without being exposed to these risk factors, suggesting the existence of other causes such as genetic predisposition, alteration of tumor suppressor genes, diet and viral agents, particularly human papillomavirus (HPV) and Epstein-Barr virus (EBV). The proposition of this study was to verify prevalence of HPV and EBV in normal oral mucosa, cancer of oral cavity and larynx, and what types are most prevalent in these two situations. For this study we established two groups: one consisting of 70 specimens embedded in paraffin, with a confirmed diagnosis of oral and larynx cancer and other with 166 individuals without lesions in the oral cavity. Laboratory analysis for the viral detection and typing HPV and EBV (EBV type 1 or 2) were performed by conventional PCR (Polymerase Chain Reaction). The typing of samples positive for HPV types (6, 11, 16, 18, 33, 35, 38, 52 and 58) was performed by real time PCR using probes specific for each type. The EBV and HPV prevalence found in the oral and laryngeal cancers was 78.6% for HPV and 84.3% for EBV and 24.1% and 45.8% for EBV and HPV, respectively, in individuals without oral lesions. The most prevalent HPV types were HPV 58 (50.9%), HPV 6 (9.1%) and HPV 16 (9.1%) in cancer group and HPV 18 (12.5%), HPV 6 (7.5%) and HPV 58 (2.5%) in the group with no lesions. The EBV 2 was more prevalent in both the cancer lesions than subjects without lesions, with a frequency of 94.9% and 82.9%, respectively. There was no association of HPV infection with EBV and sex, the prevalence being similar for men and women. Association was observed between the prevalence of HPV and EBV and its co-infections with the group that developed cancer. The prevalence of HPV and EBV and the odds ratio in the occurrence of cancer was 8.86 ($p < 0.0001$) in individuals infected with HPV and 4.08 ($p = 0.0004$) in patients infected by EBV. The probability value estimated for prevalence of HPV and EBV co-infection and the occurrence of cancer has shown that individuals infected by both viruses have 65.72% likelihood of developing cancer, while infected with HPV has 31.94% and infected with EBV 17.79%. The results of this study may suggest that viral agents (HPV and EBV) are important risk factors for the development of carcinogenesis, and HPV is more effective than EBV in triggering the disease.

Key-words: Epidemiology, Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1- Papilomavírus.....	22
Figura 2.2- Regiões do genoma do papilomavírus.....	23
Figura 2.3- Vírus Epstein-Barr.....	28
Tabela 2.1- Estimativas para o ano 2012 de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária. Inca, 2011.....	33
Figura 2.4- Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer bucal da cavidade oral por 100 mil homens, para o ano 2012, segundo Unidade da Federação. 2.4A para homens. 2.4B para mulheres. Inca, 2011.....	35
Quadro 2.1- Classificação adotada pela OMS para gradação histopatológica.....	40
Figura 4.1- Gel em agarose para detecção do HPV. 440 pb.....	51
Figura 4.2- Curva de amplificação para HPV 58.....	52
Figura 4.3 - Gel em agarose pra detecção de EBV 1 e EBV 2.....	53
Tabela 5.1- Caracterização dos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe segundo faixa etária, gênero, raça e estado civil.....	56
Tabela 5.2- Localização da lesão de câncer bucal e de laringe.....	57
Gráfico 5.1- Estadiamento da lesão de câncer bucal e de laringe.....	57
Tabela 5.3- Estadiamento da lesão de câncer bucal e de laringe em relação às faixas etárias.....	58
Tabela 5.4- Estadiamento da lesão de câncer bucal e de laringe segundo idade mediana.....	58
Tabela 5.5- Associação de tratamentos realizados nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.....	59
Tabela 5.6- Óbitos em indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.....	59
Tabela 5.7- Óbito em indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe, segundo faixa etária.....	60
Tabela 5.8- Óbito por carcinoma nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe segundo idade mediana.....	60
Tabela 5.9- Tabagismo e etilismo nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.....	60

Gráfico 5.2- Uso de prótese nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.....	61
Tabela 5.10- Associação de tabagismo e etilismo nos óbitos de indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.....	61
Gráfico 5.3- Infecção por HPV nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.....	62
Gráfico 5.4- Presença de subtipos de HPV nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.....	62
Tabela 5.11- Mortalidade por câncer segundo localização da lesão e tipo de HPV presente.....	63
Tabela 5.12- Infecção por EBV nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.....	63
Gráfico 5.5- Caracterização dos subtipos de EBV nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.....	64
Tabela 5.13- Mortalidade por câncer segundo localização da lesão e tipo de EBV presente.....	64
Tabela 5.14- Associação entre a infecção do HPV com a localização da lesão, o estadiamento e mortalidade nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.....	65
Tabela 5.15- Associação entre a infecção do HPV com faixa etária, sexo, cor da pele e estado civil dos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.....	66
Tabela 5.16- Associação entre a infecção do HPV com tabagismo, etilismo e uso de prótese dentária nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.....	67
Tabela 5.17- Associação da ocorrência de óbito e de tabagismo com a infecção por HPV.....	67
Tabela 5.18- Associação da ocorrência de óbito e de etilismo com a infecção por HPV.....	68
Tabela 5.19- Associação entre a infecção do EBV com a localização da lesão, o estadiamento e mortalidade nos indivíduos acometidos por câncer de boca.....	68
Tabela 5.20- Associação entre a infecção do EBV com faixa etária, sexo, cor da pele e estado civil dos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.....	69
Tabela 5.21- Associação entre a infecção do EBV com tabagismo, etilismo e uso de prótese dentária nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.....	70

Tabela 5.22- Associação da ocorrência de óbito e de tabagismo com a infecção por EBV nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.....	71
Tabela 5.23- Associação da ocorrência de óbito e de etilismo com a infecção por EBV nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.....	71
Tabela 5.24- Prevalência da co-infecção por HPV e EBV segundo localização da lesão de câncer de boca e laringe.....	72
Tabela 5.25- Caracterização dos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral segundo faixa etária, sexo e cor da pele.....	73
Tabela 5.26- Tabagismo e etilismo nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.....	73
Tabela 5.27- Infecção por HPV nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.....	73
Gráfico 5.6- Presença de subtipos de HPV nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.....	74
Gráfico 5.7- Infecção por EBV nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.....	74
Gráfico 5.8- Presença de subtipos de EBV nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.....	75
Tabela 5.28- Associação entre a infecção do HPV com faixa etária, sexo e cor da pele dos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.....	75
Tabela 5.29- Associação entre a infecção do HPV com tabagismo e etilismo nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.....	76
Tabela 5.30- Associação entre a infecção do EBV com faixa etária, sexo e cor da pele dos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.....	76
Tabela 5.31- Associação entre a infecção do EBV com tabagismo e etilismo nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.....	77
Tabela 5.32- Caracterização dos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe e grupo de raspado bucal segundo faixa etária, sexo e cor da pele.....	77
Tabela 5.33- Caracterização dos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe e grupo de raspado bucal segundo tabagismo e etilismo.....	78
Tabela 5.34- Prevalência da infecção por HPV e EBV e suas co-infecções nos grupos amostrais estudados.....	78
Tabela 5.35- Ocorrência de câncer segundo caracterização de subtipos de HPV e EBV.....	79

Tabela 5.36- Prevalência de infecção por HPV e EBV e razão de chances na ocorrência do câncer.....	80
Tabela 5.37- Prevalência da co-infecção por HPV e EBV e valor probabilístico estimado para a ocorrência de câncer.....	80
Quadro 6.1- Localização do câncer bucal em diferentes estudos.....	82
Tabela 6.1- Frequência de HPV e subtipos em câncer bucal.....	86
Tabela 6.2- Frequência de HPV, EBV e co-infecções em câncer bucal.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
bp	Pares de bases
CEO	Centro de Especialidades Odontológicas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CD	Cluster of differentiation (Grupamento de diferenciação)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Região precoce do genoma viral
EBNA	Antígeno nuclear do Epstein Barr
EBV	Vírus Epstein Barr
ESF	Estratégia Saúde da Família
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
GP5	Glicoproteína 5
GP6	Glicoproteína 6
HBV	Vírus da hepatite B
HCV	Vírus da hepatite C
HHV-8	Vírus do sarcoma de Kaposi
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HPV	Papilomavírus humano
HTLV	Vírus linfotrópico para células T humanas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L	Região tardia do genoma viral
LB	Linfoma de Burkitt
LCR	Região longa de controle
LMP	Proteína latente de membrana
µL	Microlitro
NCR	Região não codificadora
NK	Natural killer
NMT	Núcleo de Medicina Tropical
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Odds ratio
ORF	Open Reading Frames (sequência de leitura aberta)

ORp	Razão de chances de prevalência
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PBS	Tampão fosfato-salino
RPM	Rotação por minuto
RSV	Vírus do sarcoma de Rous
SUS	Sistema Único de Saúde
TBE	Trisborato EDTA
TNM	Tumor Nódulo Metástase
UFPA	Universidade Federal do Pará
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1. VIRUS ONCOGÊNICOS.....	21
2.2. PAPILOMAVÍRUS HUMANO.....	22
2.2.1. Classificação e morfologia.....	22
2.2.2. Papel oncogênico do HPV.....	25
2.2.3. Diagnostico do HPV.....	26
2.3. VÍRUS EPSTEIN-BARR.....	27
2.3.1. Composição e morfologia.....	28
2.3.2. Patogênese do EBV.....	29
2.4. CÂNCER.....	31
2.4.1. Epidemiologia do câncer.....	32
2.5. CÂNCER BUCAL.....	33
2.5.1. Definição câncer bucal.....	33
2.5.2. Epidemiologia do câncer bucal e de laringe.....	34
2.5.3. Etiologia do câncer bucal e de laringe.....	37
2.5.4. Diagnóstico do câncer bucal e de laringe.....	38
2.5.5. Graduação histopatológica.....	39
2.5.6. Estadiamento.....	41
2.5.7. Tratamento do câncer bucal e de laringe.....	41
2.6. PREVALÊNCIA DE HPV E EBV EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE CANCER BUCAL E DE LARINGE.....	43
3. OBJETIVOS.....	46
3.1. OBJETIVO GERAL.....	46
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	47
4.2. SELEÇÃO DE CASOS.....	47
4.3. ANÁLISE LABORATORIAL.....	48
4.4. ASPECTOS ÉTICOS.....	54
4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5 RESULTADOS.....	56

6. DISCUSSÃO.....	81
7. CONCLUSÕES.....	95
REFERÊNCIAS.....	97
APÊNDICES.....	109
ANEXOS.....	116

1. INTRODUÇÃO

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de cem doenças que tem o crescimento de células desordenado em comum. Por se dividirem rapidamente essas células apresentam uma tendência de serem bastante agressivas e incontroláveis, levando a formação de tumores malignos que podem levar a metástase (INCA, 2012).

O câncer bucal é a sexta malignidade mais comum em países desenvolvidos, representando quase 3% dos tumores malignos e mais de 95% deles são carcinomas de células escamosas (MIGALDI et al., 2012). É um problema crescente de saúde pública no Brasil, já que preenche as três condições essenciais descritas por Sinai para um problema ser caracterizado como de saúde pública: ser causa comum de morbidade e mortalidade, existirem métodos eficazes de prevenção e controle e estes não serem utilizados de maneira adequada pela população (CHAVES, 1986).

A falta de uma organização sistêmica de atenção integral no Brasil, em todos os níveis dos serviços de saúde, que contemplem os princípios doutrinários do Sistema Único de Saúde de Universalidade, Integralidade e Equidade é responsável pela dificuldade do diagnóstico precoce e tratamento imediato eficaz na população, provocando assim, uma intervenção tardia com sequelas que provocam incapacidades que interferem na qualidade de vida, além de aumentar a letalidade. A organização do sistema permitiria intervenções adequadas e inclusão social dos indivíduos nos Sistemas Locais de Saúde.

A principal sintomatologia do câncer bucal é o aparecimento de lesões na boca que não cicatrizam em uma semana. Também são sintomas frequentes ulcerações superficiais, com menos de 2 cm de diâmetro, indolores com sangramento ou não e manchas esbranquiçadas ou avermelhadas nos lábios ou na mucosa bucal. Em estágio avançado os portadores deste câncer apresentam dificuldade para falar, mastigar e engolir, além de emagrecimento acentuado, dor e presença de linfadenomegalia cervical (INCA, 2012).

Os sintomas do câncer de laringe estão diretamente ligados à localização da lesão. Assim, a dor de garganta sugere tumor supraglótico e rouquidão indica tumor glótico ou subglótico. O câncer supraglótico geralmente é acompanhado de outros sinais, como alteração na qualidade da voz, disfagia leve (dificuldade de engolir) e

sensação de "caroço" na garganta. Nas lesões avançadas das cordas vocais, além da rouquidão, podem ocorrer dor na garganta, disfagia e dispneia (INCA, 2012).

O tabagismo e o álcool são considerados os principais causadores do câncer bucal e de laringe. Porém, uma parte da população desenvolve a doença sem estar exposta a estes fatores de risco, sugerindo a existência de outras causas como: predisposição genética, dieta e agentes virais, em particular o *Papilomavírus humano* (HPV) e o vírus Epstein-Barr (EBV).

As infecções pelo HPV são disseminadas, com prevalência em todo o mundo. Os HPVs infectam a pele e as mucosas, podendo induzir a formação de tumores epiteliais benignos e malignos (CASTRO; BUSSOLOTI FILHO, 2006).

O HPV é universalmente aceito como agente etiológico do câncer de colo de útero e recentemente, vem se especulando sobre sua possível relação com o câncer oral, laringe e orofaringe (CHEN et al., 2012; MARUR et al., 2010; CHAUDHARY et al., 2009; NGUYEN et al., 2009; XAVIER et al., 2005).

O EBV está associado a várias desordens proliferativas benignas e malignas de origem linfoide, tais como mononucleose infecciosa, linfoma de Burkitt, doença de Hodgkin, linfoma associado a AIDS e doença linfo proliferativa pós-transplante, onde o seu papel oncogênico tem sido largamente estudado. Tem uma relação bem documentada em tumores sólidos, como o carcinoma de nasofaringe. O carcinoma oral de células escamosas, laringe e de glândulas salivares tem sido associados com o EBV em estudos recentes (BAGAN et al., 2008; GRINSTEIN et al., 2002).

Alguns estudos indicam que o EBV pode estabelecer infecção latente com expressão de genes latentes em células de carcinoma oral e de laringe, indicando que o mesmo possa participar no desenvolvimento desta neoplasia ou atuar junto de fatores de risco, como o fumo e o álcool (PEREIRA DE LIMA; RABENHORST, 2006).

A prevalência do HPV e do EBV na mucosa oral normal e câncer oral e de laringe tem gerado resultados contraditórios. Sua prevalência varia muito nos estudos realizados até a presente data. Esta discrepância observada é atribuída à variação da sensibilidade dos métodos empregados e a fatores epidemiológicos dos grupos de pacientes examinados.

Este estudo tem como proposição verificar a prevalência do HPV e do EBV na mucosa oral normal e no câncer bucal e de laringe e quais os tipos mais prevalentes nestas duas situações.

2. REFERENCIAL TÉORICO

2.1. VÍRUS ONCOGÊNICOS

O câncer foi reconhecido como doença há mil anos. Diferentes teorias da causa do câncer foram estabelecidas, mas nenhuma considerava a possibilidade de etiologia infecciosa até o século XX (JAVIER; BUTEL, 2008).

A evidência de que alguns cânceres poderiam ter etiologia viral iniciou em 1908 após Ellerman e Bang demonstrarem que a leucemia de galinhas poderia ser transmitida a outras aves da mesma espécie através de inoculação de filtrados de células tumorais. Peyton Rous, em 1911, mostrou que o sarcoma de galinhas era transmitido da mesma forma. O sarcoma de aves, induzidos por vírus do sarcoma de Rous (RSV), como se tornou conhecido, foi mostrado um ano antes por Rous para representar um câncer genuíno, semelhante a tumores sólidos malignos observados em mamíferos (JAVIER; BUTEL, 2008; ROMANOS et al., 2008).

Seguiram-se estudos realizados por Bittner em 1936, que constatou que o carcinoma mamário de camundongos era induzido por um vírus transmitido verticalmente através do leite e por Gross e Friend que identificaram dois vírus relacionados à leucemia de camundongos (ROMANOS et al., 2008).

Em 1953, Watson, Crick e Wilkins demonstraram a estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA) e como a informação genética é codificada. A seguir Vogt e Dulbecco mostraram que células normais poderiam ser transformadas em cancerosas ao entrarem em contato com certos vírus (JAVIER; BUTEL, 2008; ROMANOS et al., 2008).

Em torno de 15% dos cânceres humanos tem etiologia viral, contudo é importante frisar que a infecção viral não é suficiente para provocar a malignidade sozinha. A infecção viral é um dos passos envolvidos no desenvolvimento do câncer (DE MARCO et al., 2012; SZARKA et al., 2009; ROMANOS et al., 2008).

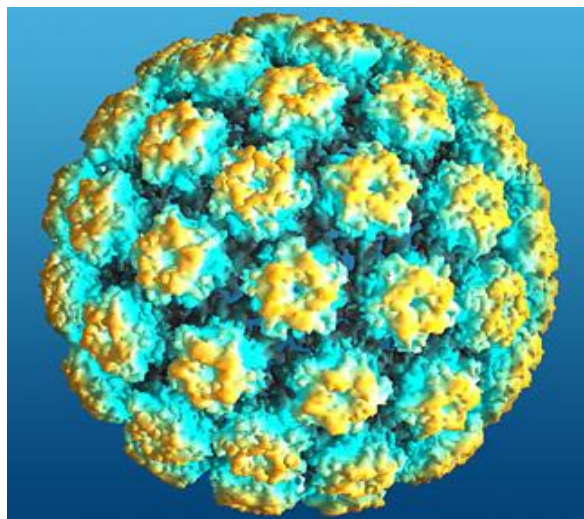
Vírus oncogênicos são vírus que participam do processo de transformação celular, estabelecendo uma associação com a célula infectada, criando condições de manter seu ciclo replicativo em vez de destruí-la. Os principais vírus associados à oncogênese humana são: vírus linfotrópico para células T de humanos tipo 1 (HTLV-1) e tipo 2 (HTLV-2); vírus Epstein-Barr (EBV); vírus do sarcoma de Kaposi (HHV-8); vírus do papiloma humano (HPV); vírus da hepatite B (HBV) e vírus da hepatite C (HCV) (ROMANOS et al., 2008).

2.2. PAPILOMAVIRUS HUMANO – HPV

2.2.1. Classificação e morfologia

Os papilomavírus são classificados na família *Papillomaviridae* e infectam diferentes hospedeiros vertebrados (Figura 2.1). Atualmente a classificação é baseada na homologia da sequência de leitura aberta L1(ORF – open reading frames), que codifica a principal proteína estrutural do vírus. Com base nesse critério, os papilomavírus estão classificados em 12 gêneros, designados por uma letra do alfabeto grego. Os papilomavírus humanos estão agrupados em cinco gêneros: *Alpha-papillomavirus*, *Beta-papillomavirus*, *Gamma-papillomavirus*, *Mu-papillomavirus* e *Nu-papillomavirus*. A maioria dos *Alpha-papillomavirus* infecta a mucosa genital e não genital e genitália externa, embora uma espécie desse gênero infecte a pele em regiões não genitais. Os gêneros *Beta*, *Gamma*, *Mu* e *Nu-papillomavirus* infectam a pele em regiões não genitais (ROMANOS et al., 2008).

Figura 2.1- Papilomavírus.



Fonte: www.virishpv.com.br. 2011

O HPV é a abreviatura utilizada para identificar o Papilomavírus humano, causador do condiloma acuminado (do grego *kondilus* = tumor redondo e do latim *acuminare* = tornar pontudo). São vírus ubíquos, epiteliotrópicos, que infectam epitélio cutâneo e mucoso (CASTRO; BUSSOLOTI FILHO, 2006).

Com 55nm de diâmetro, o HPV é formado por um capsídeo que possui 72 capsômeros de estruturas icosaédricas, sem envelope lipoprotéico, que protege uma molécula circular dupla de DNA, composto de 7200 a 8000 pares de base, com peso

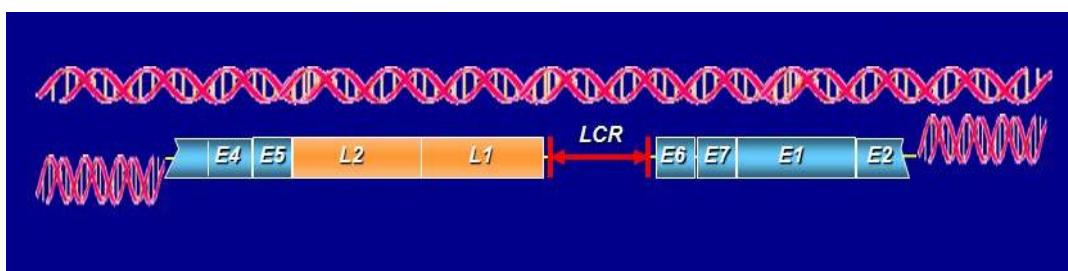
molecular de 5.2×10^6 Daltons. O amadurecimento da partícula viral é dependente dos mecanismos de diferenciação celular dos ceratinócitos, o qual propicia a replicação, síntese do capsídeo e montagem do vírus. Não podem ser suficientemente cultivados em culturas teciduais ou modelos animais (BOULET et al., 2007; LONGWORTH; LAIMINS, 2004; OLIVEIRA et al., 2003).

O HPV foi o primeiro vírus tumorogênico a ser transmitido experimentalmente de um hospedeiro para outro. Em 1894 Licht se inoculou com material da verruga de seu irmão, verificando o aparecimento de uma verruga no local da inoculação. Em 1907 Ciuffo demonstrou a etiologia viral das verrugas cutâneas, inoculando um extrato preparado de filtrado de verrugas na própria mão (ROMANOS et al., 2008).

O genoma do papilomavírus pode ser dividido em três regiões: uma região longa de controle (LCR), compreendendo cerca de 10% do genoma e as regiões precoce (E) e tardia (L). O alinhamento das sequências de DNA do HPV revela uma organização genética de regiões que codificam proteínas virais (ORF). Essas estão presentes em uma só fita de DNA e suas funções foram apontadas, em parte, através da comparação com a estrutura do papilomavírus bovino tipo 1, que foi caracterizado em linhagens celulares de camundongos geneticamente transformados (OLIVEIRA et al., 2003).

Geralmente, a região E se expressa logo depois da infecção e codifica as proteínas envolvidas na indução e regulação da síntese de DNA. A região L, por sua vez, é expressa em estágios posteriores da infecção e codifica as proteínas do capsídeo viral. A região E é dividida em E1 a E7, e a região L em regiões L1 e L2 (Figura 2.2). Do ponto de vista da transformação celular, as regiões E5, E6 e E7 são de maior importância (GONÇALVES; DONADI, 2004; OLIVEIRA et al., 2003).

Figura 2.2- Regiões do genoma do papilomavírus



Adaptada de Oliveira et al., 2003.

A sequência entre o fim de L1 e o começo de E6 é chamada de LCR e é conhecida também como região não codificadora (NCR). Essa região contém várias das sequências regulatórias que controlam a transcrição e a replicação viral. Existem várias evidências que a progressão do câncer induzida pelo HPV é um processo de múltiplas etapas. As LCRs estão envolvidas diretamente no mecanismo regulatório intra-celular, mecanismo este, que quando alterado, concorre para a progressão da malignidade, correlacionando-se com uma abundante expressão gênica viral (OLIVEIRA et al., 2003).

De acordo com os subgrupos de HPV, os mesmos podem ser classificados como cutâneos: capazes de infectar a pele e mucosos que são quase exclusivos de regiões urogenitais e buco respiratórias (ROMANOS et al., 2008).

Até o momento foram identificados cerca de 100 tipos de HPVs classificados de acordo com a distribuição dos ácidos nucleicos no genoma viral, sendo os subtipos 1, 2, 4, 6, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32 e 57 encontrados na cavidade oral (KELLOKOSKI et al., 1990; XAVIER et al., 2005).

Quinze tipos de HPV são considerados como de alto risco: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82. Três são classificados como prováveis alto risco: 26, 53 e 66 e doze são classificados com baixo risco: 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP 6108 (SHEU et al., 2007; BASEMAN; KOUTSKY, 2005).

As formas clínicas de infecção pelo HPV mais comuns são: 1-Latente, onde o DNA do HPV é diagnosticado por técnicas moleculares, porém sem existência de evidências clínicas, citológicas, colposcópicas ou histológicas desta infecção; 2-Subclínica, onde ao invés do HPV produzir um condiloma clássico, a doença se caracteriza por áreas difusas de hiperplasia epitelial não papilíferas; 3- Clínica, onde os condilomas dependendo do tamanho e localizações anatômicas podem ser dolorosos, friáveis e/ou pruriginosos, tanto no colo uterino, vagina, uretra, ânus e boca (ROMANOS et al., 2008).

A maioria das infecções pelo HPV é assintomática (latentes e subclínicas), sendo muito pequena a proporção de infecções, de 1 a 2%, que levam a lesões aparentes. Assim como algumas outras infecções virais, as infecções latentes podem ser decorrentes das seguintes situações: exposição ao vírus sem resultar em infecção; exposição ao vírus com penetração do mesmo na célula hospedeira, mas sem replicação viral ou sem a maturação completa do vírus (XAVIER et al., 2007).

2.2.2. Papel oncogênico do HPV

Infecções pelo HPV são consideradas como a doença sexualmente transmitida mais comum, com uma incidência de 1% e prevalência de mais de 50%. Aproximadamente 6,2 milhões de casos novos de HPV são diagnosticados a cada ano nos Estados Unidos, com uma estimativa de 20 milhões de casos atuais. Prevalência mundial de HPV genital é estimada em 440 milhões, destes 29 milhões são mulheres, causando 510.000 casos de câncer cervical e aproximadamente 288.000 mortes (FOLDVARI, 2012).

O HPV é universalmente aceito como agente causal do câncer de colo uterino e, em anos recentes vem se especulando sua possível relação com o câncer de cavidade oral e orofaringe. O HPV 16 é o tipo mais comum associado a câncer oral e de colo de útero, enquanto os tipos 6 e 11 são os mais frequentes em lesões benignas e pré-malignas e raramente nas lesões neoplásicas da cabeça e pescoço (XAVIER et al., 2005; LO MUZIO et al., 2004; SNIJDERS et al., 1996).

Os HPVs são um grupo de vírus de DNA em que alguns tem uma notável especificidade, induzindo lesões hiperplásicas, papilomatosas, verrucosas e lesões escamosas epiteliais na pele e em vários locais da mucosa, incluindo trato anogenital, uretra, laringe, mucosa traqueobronqueal, nasal e cavidade oral (SASAGAWA et al., 2012; CORRENTI et al., 2004).

A infecção pelo HPV é iniciada quando uma partícula viral penetra em células basais e células indiferenciadas e em divisão do epitélio. Ao menor trauma, o vírus pode penetrar na camada basal do epitélio. Nas células basais e parabasais, o DNA viral replica em um baixo padrão e apenas genes precoces são transcritos, também em baixo padrão. Multiplicação extensiva do DNA viral e transcrição de todos os genes virais, bem como formação do capsídeo, ocorrem somente nas camadas mais superficiais do epitélio. O vírus multiplica-se exclusivamente no núcleo de células infectadas, mas a manifestação patológica associada ao HPV é confinada aos sítios onde a infecção foi iniciada. Partículas virais maduras, com capsídeos completos, estão ausentes nas células basais, e a replicação produtiva do HPV está restrita às células nos estratos espinhoso e granuloso (SOARES et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2003).

Os achados comuns dos mesmos tipos de HPV (6, 11, 16 e 18) em mucosa oral e genital são um forte indicativo para a transmissão oro genital. A maioria das infecções por HPV é resultado de uma auto-inoculação de um sítio genital ou oral

próprio para o outro. Pode ser transmitido precocemente, durante o nascimento, do trato genital da mãe para a cavidade oral da criança (OLIVEIRA et al., 2003).

2.2.3. Diagnóstico do HPV

O diagnóstico da infecção pelo HPV é clínico, baseado na visualização das verrugas a olho nu. Métodos de diagnóstico laboratorial foram desenvolvidos para utilização principalmente na infecção anogenital. Testes que não são específicos para HPV podem revelar a presença de alterações celulares que podem ser indicativas de infecção por esse vírus. Entretanto a infecção pelo HPV pode ocorrer sem alterações citopatológicas, e dessa forma, é importante associar testes específicos e inespecíficos (ROMANOS et al., 2008).

Entre os testes inespecíficos importantes para diagnóstico de infecção pelo HPV pode-se citar a colposcopia, citopatologia e histopatologia, e nos específicos a microscopia eletrônica, imunocitoquímica e testes para detecção do ácido nucléico viral (ROMANOS et al., 2008).

O diagnóstico do HPV na mucosa oral pode ser realizado pelo exame clínico da lesão, citologia e biopsia (CASTRO; BUSSOLOTI FILHO, 2006).

Além da anamnese e do quadro clínico, o diagnóstico por HPV, deve ser confirmado por técnicas histológicas e citológicas sempre que necessário. O diagnóstico clínico-laboratorial de rotina é feito com a ajuda da aplicação de ácido acético 4% e 2% nas lesões genitais e orais respectivamente, para a visualização a olho desarmado das lesões papilomatosas (brancacentas) e pelo exame citológico de Papanicolau convencional, que é feito através de raspados bucais, para o rastreamento de células malignas, mas também, como método de detecção de lesões pré-cancerígenas e infecciosas (ROMANOS et al., 2008).

O avanço de outras técnicas diagnósticas, como as técnicas de citologia líquida, biologia molecular, sistema de captura híbrida e de imunohistoquímica, tem possibilitado o maior conhecimento sobre a carcinogênese viral (CASTRO; BUSSOLOTI FILHO, 2006).

A sensibilidade e especificidade dos vários métodos de detecção do HPV variam amplamente. São três as categorias que avaliam a sensibilidade dos métodos de análise: os de baixa sensibilidade (imunoperoxidase, imunofluorescência e hibridização *in situ*), que só detectam o vírus quando estão presentes em mais de 10 cópias do DNA viral por célula; os considerados de

moderada sensibilidade (*Southern blot*, *dot blot* e hibridização *dot* reversa), que detectam o vírus quando de 1 a 10 cópias do DNA viral estiverem presentes; e os de alta sensibilidade (Reação em Cadeia de Polimerase), por detectarem o vírus quando menos de uma cópia do DNA viral estiver presente (SOARES et al., 2003; CASTRO; BUSSOLOTI FILHO, 2006).

Atualmente o método mais indicado para detecção do HPV se baseia na identificação da presença do DNA viral por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR). Esta técnica de ampliação em cadeia de sequências de DNA pela PCR vem sendo bastante utilizada no diagnóstico das infecções por HPV, devido necessitar de pouco material para a sua realização, além de ser altamente sensível e específica, podendo ser efetuada em espécimes históricos (tecidos fixados e emblocados em parafinas ou células estocadas pelo método de citologia líquida). Isto permite análises retrospectivas do material de pacientes já diagnosticados para a presença de câncer, aprimorando a epidemiologia dos casos positivos de câncer associados à presença do HPV (SOARES et al., 2003; CASTRO; BUSSOLOTI FILHO, 2006).

A detecção do HPV pela PCR é geralmente realizada usando um dos iniciadores *consensus*, o MY09-MY11 ou o GP5/GP6. Apesar da PCR permitir uma avaliação aprofundada dos dados epidemiológicos, incluindo a prevalência de infecções subclínicas ou latentes, ela tem a desvantagem de que a amplificação de quantidades minúsculas de DNA de HPV contaminantes possa levar a resultados falsos positivos (CASTRO; BUSSOLOTI FILHO, 2006).

A avaliação da eficácia de diferentes técnicas para a detecção do HPV é importante e fundamental para estabelecer o papel etiológico do HPV nas lesões orais. Uma análise contínua de novos métodos é essencial para a interpretação da história natural da infecção pelo HPV na cavidade oral. Testes de amplo espectro para o HPV, de fácil realização e custo acessível são esperados e desempenharão um papel importante nos sistemas de diagnóstico molecular (KRISTOFFERSEN et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2003).

2.3. VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV)

A descrição do vírus Epstein-Barr ocorreu a partir de um estudo para a possível verificação da etiologia do linfoma de Burkitt (LB) em várias tribos de diferentes regiões da África, quando um cirurgião inglês, Denis Burkitt, observou em duas crianças da região de Kampala a presença de tumores de aspecto multifocal

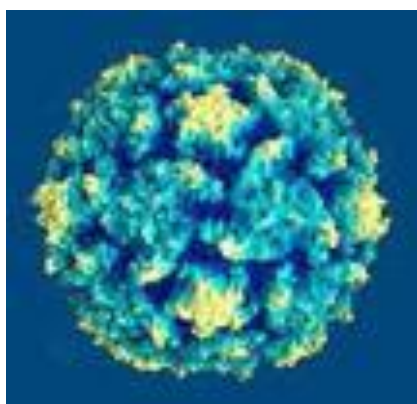
nos maxilares. Burkitt coletou células do linfoma de uma das crianças e as enviou para Anthony Epstein em Londres, que estabeleceu linhagens derivadas das células do LB em laboratório (ROMANOS et al., 2008; SLOTS et al., 2006).

Em 1964 Epstein, Achong e Barr determinaram o agente causador do LB, um membro previamente desconhecido da família de herpesvírus, sendo o vírus posteriormente chamado de vírus Epstein-Barr, com a finalidade de homenagear Epstein e sua estudante de pós-graduação Yvonne-Barr, que adoeceu de mononucleose infecciosa enquanto conduzia um estudo soro epidemiológico sobre o LB, proporcionando a associação entre o vírus observado no LB e o quadro de mononucleose infecciosa. EBV foi o primeiro vírus humano considerado como potencialmente oncogênico (TSAO et al., 2012; SLOTS et al., 2006).

2.3.1. Composição e morfologia

O vírus Epstein-Barr (Figura 2.3) é membro da família *Herpesviridae*, subfamília *Gamaherpesvirinae*, gênero *Lymphocryptovirus*; também é denominado herpesvírus humano tipo 4 (HHV-4). A família *Herpesviridae* inclui ainda outros herpesvírus patogênicos para o homem: o herpes simples I e II, vírus varicela-zoster, citomegalovírus e o herpes vírus 6, 7 e 8 (THOMPSON; KURZROCK, 2004; IKUTA et al., 2000).

Figura 2.3 – Vírus Epstein-Barr.



Fonte: www.alka.com.br. 2011.

É um vírus biologicamente e antigenicamente diferente de outros vírus pertencentes a família *Herpesviridae*. Ele é transmitido pelo contato salivar e

estabelece uma infecção latente ao longo da vida que geralmente é assintomática (ROMANOS et al., 2008; WU et al., 2007).

O EBV também tem sido encontrado presente nas secreções genitais de ambos os sexos, sugerindo que a transmissão sexual também pode ocorrer (HIGGINS et al., 2007).

O EBV é um gama-herpes vírus constituído de DNA linear fita dupla, envolvido por um capsídeo icosadeltaédrico, composto de 162 capsômeros, recoberto por um envelope glicoproteico (CHEN, 2011; PEREIRA DE LIMA; RABENHORST, 2006).

Seis antígenos nucleares do Epstein-Barr (EBNAs) foram descritos até o momento: EBNA 1, EBNA 2, EBNA 3A, EBNA 3B, EBNA 3C E EBNA-LP, juntamente com as proteínas de latência presentes em membranas (*latente membrane protein* – LMP1, LMP2A e LMP2B), e dois RNAs pequenos (EBER 1 e EBER 2) (CHEN, 2011; ROMANOS et al., 2008).

LMP1 é considerada a oncoproteína principal do EBV, sua expressão é requerida para a infecção do EBV e transformação de células B (GONZÁLEZ et. al., 2010).

Dois subtipos de EBV são conhecidos em infecções humanas: EBV 1 e EBV 2, anteriormente conhecidos como EBV A e B. Eles diferem na organização dos genes que codificam o antígeno nuclear do EBV (EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B e EBNA-3C). EBV 2 transforma células B menos eficientemente que EBV 1 *in vitro*, e a viabilidade da linhagem das células linfoblastos de EBV 2 é menor que as de linhagem EBV 1 (ROMANOS et al., 2008; THOMPSON; KURZROCK, 2004).

2.3.2. Patogênese do EBV

Sabe-se atualmente que o EBV infecta mais de 90% da população mundial adulta. O EBV é transmitido pela saliva, infectando primeiramente as células epiteliais da orofaringe, nasofaringe e glândulas salivares, por receptores ainda não identificados, onde frequentemente ocorre replicação (WHITE et al., 2012; PEREIRA DE LIMA; RABENHORST, 2006).

Posteriormente, os vírus alcançam tecidos linfoides adjacentes e infectam linfócitos B através da ligação entre a glicoproteína viral gp350/220 e o receptor CD21 (CR2) do componente C3d do sistema complemento. Após essa associação, o vírus penetra nos linfócitos B por fusão do envoltório com a membrana celular e o

capsídeo é então liberado no citoplasma. O genoma antes linear é transportado para o núcleo tornando-se circular e permanecendo em estado latente, sob a forma de DNA epissomal extracromossômico (THOMPSON; KURZROCK, 2004; PEREIRA DE LIMA; RABENHORST, 2006).

Apesar das propriedades de transformação do crescimento do EBV, o sistema imunológico da maioria dos indivíduos controla a infecção e ajuda a prevenir o desenvolvimento de tumores. Assim, a infecção por EBV serve como um paradigma de controle imunológico ao longo da vida de um vírus de tumor humano clinicamente importante (WHITE et al., 2012).

O EBV está associado a várias desordens proliferativas benignas e malignas de origem linfóide, como mononucleose infecciosa, linfoma de Burkitt, doença de Hodgkin e doença linfoproliferativa pós-transplante, nas quais o seu papel oncogênico tem sido largamente estudado. Atualmente, novos achados têm demonstrado a relação do EBV com outros tipos de tumores sólidos como carcinoma de nasofaringe, carcinoma gástrico, neoplasias da musculatura lisa, carcinoma intracervical, carcinoma hepatocelular, câncer de mama e pulmão, carcinoma de glândula salivar e carcinoma oral (GROMA et al., 2012; RAAB-TRAUB, 2012; PEREIRA DE LIMA; RABENHORST, 2006; RYAN et al., 2004; MESQUITA, 2002).

EBV é mais prevalente em lesões orais malignas e potencialmente malignas quando comparadas com mucosas orais saudáveis. Mucosa oral é o local de maior replicação do EBV. O EBV é capaz de infectar linfócitos B, células epiteliais escamosas, células epiteliais glandulares, células mioepiteliais, células musculares lisas, células T e NK, células plasmáticas, células dendríticas e macrófagos/células de Langherans (GROMA et al., 2012).

EBV é frequentemente detectado em amostras de sangue de indivíduos saudáveis e a maioria dos europeus soropositivos saudáveis são EBV do tipo 1, enquanto indivíduos imunossuprimidos, como pacientes infectados com HIV (vírus da imunodeficiência humana) e pacientes transplantados tem uma alta taxa de infecção com EBV do tipo 2 (WU et al., 2007).

Outros estudos revelaram que o tipo 2 também foi encontrado com frequência na população normal dos Estados Unidos e não somente em áreas endêmicas do linfoma de Burkitt, como a África Central e Nova Guiné (HIGA et al, 2002, SCULLY et al., 1990).

Os testes sorológicos para a detecção de anticorpos contra o EBV são a principal ferramenta para confirmação do diagnóstico. Testes de imunofluorescência foram os primeiros a serem utilizados para a soro epidemiologia da infecção do EBV. Depois foram desenvolvidos ensaios imunoenzimáticos e outros testes sorológicos para detecção de anticorpos, baseados em peptídeos virais específicos. A detecção do DNA viral pode ser feita utilizando imunohistoquímica, imunocitoquímica e microscopia eletrônica. Testes de PCR (reação em cadeia de polimerase) quantitativos e semiquantitativos foram desenvolvidos para a detecção de DNA no sangue periférico (ROMANOS et al., 2008).

2.4. CÂNCER

Câncer é um termo genérico usado para todos os tumores malignos. O termo “câncer” vem do latim *cancer*, “caranguejo”, é a tradução latina da palavra grega *carcinoma*, de *karkinos*, “crustáceo, caranguejo” (CERRI; BORDINI, 2003).

A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia. A primeira dificuldade que se enfrenta no estudo das neoplasias é a sua definição, já que ela se baseia na morfologia e na biologia do processo tumoral. Assim, a definição de neoplasia modifica-se com a evolução dos conhecimentos. Atualmente refere-se a neoplasia como uma proliferação anormal de tecido, que foge parcial ou totalmente ao controle do organismo e tende a autonomia e a perpetuação, com efeitos agressivos sobre o hospedeiro (COTRAN et al., 2005; BRASIL, 2010).

As neoplasias podem ser benignas ou malignas. As neoplasias ou tumores benignos tem seu crescimento de forma organizada, geralmente lento, expansivo e apresentam limites bem definidos, podem comprimir os órgãos e tecidos adjacentes apesar de não invadi-los. Já as neoplasias ou tumores malignos manifestam um maior grau de autonomia e são capazes de invadir tecidos vizinhos e provocar metástases, podendo ser resistentes ao tratamento e causar morte do hospedeiro (INCA, 2012).

O câncer não é uma doença única, mas um grupo de doenças. Os cânceres podem originar-se em muitos tecidos diferentes do corpo. Alguns crescem agressivamente, outros lentamente. Alguns tipos de câncer podem ser detidos por tratamento médico apropriado, outros não (SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

Aproximadamente 200 tipos de câncer são relatados, correspondendo aos vários sistemas de células do corpo, os quais se diferenciam pela capacidade de invadir tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes (ALMEIDA et al., 2005).

2.4.1. Epidemiologia do câncer

Nas últimas décadas o câncer tornou-se um evidente problema de saúde pública mundial. Anteriormente considerado uma doença de países desenvolvidos e grandes recursos financeiros, nas últimas décadas tem sido observado em países em desenvolvimento, principalmente nos com poucos e médios recursos (INCA, 2011).

O câncer é a segunda causa de morte nos Estados Unidos e no Brasil, somente as doenças cardiovasculares ultrapassam essa taxa. O tipo mais comum de câncer nos Estados Unidos envolve a glândula prostática em homens. O câncer de mama em mulheres e o câncer de pulmão em ambos os gêneros também são comuns (STRICKER; KUMAR, 2008; INCA, 2011).

A incidência do câncer varia de acordo com a idade, etnia, fatores geográficos e condições genéticas. Em alguns casos, uma predisposição a desenvolver câncer é herdada. Entretanto, a maioria dos casos de câncer decorre do acúmulo de mutações espontâneas nos tecidos somáticos. Os cânceres são mais comuns nos dois extremos de idade (SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

As variações geográficas resultam, na maioria das vezes, de exposições ambientais diferentes (SNUSTAD; SIMMONS, 2008; STRICKER; KUMAR, 2008).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA), órgão do Ministério da Saúde, estimou que em 2012 ocorressem 518.510 novos casos de câncer no Brasil (INCA, 2011), sendo 14.170 casos na cavidade oral e 6.110 de laringe (Tabela 2.1).

O câncer de pele (não melanoma) é o câncer com maior incidência de casos novos, seguido do câncer de próstata e de mama (INCA, 2011). O câncer de cavidade oral aparece em oitavo lugar em frequência de ocorrência, sendo um dos principais problemas da cavidade oral, vindo em ordem decrescente abaixo da cárie dentária, doença periodontal, deformidades dentofaciais e das fissuras lábiopalatinas (INCA, 2011; DIAS et al., 2006).

Tabela 2.1 – Estimativas para o ano 2012 de número de casos novos por câncer, em homens e mulheres, segundo localização primária.

Localização primária da neoplasia maligna	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	60.180	-	60.180
Mama feminina	-	52.680	52.680
Colo de útero	-	17.540	17.540
Traquéia, brônquio e pulmão	17.210	10.110	27.320
Cólon e reto	14.180	15.960	30.140
Estômago	12.670	7.420	20.090
Cavidade oral	9.990	4.180	14.170
Laringe	6.110	-	6.110
Bexiga	6.210	2.690	8.900
Esôfago	7.770	2.650	10.420
Ovário	6.190	-	6.190
Linfoma Não Hodgkin	5.190	4.450	9.640
Glândula Tireoide	-	10.590	10.590
Sistema Nervoso Central	4.820	4.450	9.270
Leucemias	4.570	3.940	8.510
Corpo do útero	-	4.520	8.900
Pele melanoma	3.170	3.060	6.230
Outras localizações	43.120	38.720	81.840
Subtotal	195.190	189.150	384.340
Pele não melanoma	62.680	71.490	134.170
Todas as Neoplasias	257.870	260.640	518.510

Fonte: (BRASIL, 2011)*

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 100

2.5. CÂNCER BUCAL

2.5.1. Definição de câncer bucal

Câncer bucal é uma categoria abrangente de localização para neoplasias e inclui tumores de diferentes etiologias e perfis histológicos, embora se refira ao carcinoma de células escamosas principalmente. Os termos câncer de boca, câncer bucal e câncer oral, são muito abrangentes, podendo a falta de especificação gerar confusões. Ao se referir ao câncer de cavidade bucal alguns autores excluem tumores nos lábios e/ou glândulas salivares (BIAZEVIC; ANTUNES, 2006; MOORE et al., 2000).

Para Lopes (2003) o câncer de boca é uma denominação que inclui os cânceres de lábio, mucosa jugal, gengivas, palato duro, língua, assoalho de boca e amígdalas.

Uma perspectiva analítica mais abrangente permite aplicar o termo câncer bucal aos tumores de amígdala e da orofaringe. Outros tipos de integração entre as localizações anatômicas das neoplasias são usados nos estudos epidemiológicos sobre o câncer bucal. Alguns estudos abordam o câncer de faringe em conjunto com o câncer de boca. Também é frequente a abordagem em conjunto das neoplasias de hipofaringe e de laringe, em função da dificuldade em diferenciar a localização primária desses tumores, aliada a caracterização histológica do carcinoma epidermóide ser a mais prevalente para ambas as topografias (BIAZEVIC; ANTUNES, 2006; MOORE et al., 2000).

Em decorrência dessa multiplicidade de recortes no estudo da doença é importante que os pesquisadores definam quais topografias estão efetivamente sendo consideradas em seus trabalhos (BIAZEVIC; ANTUNES, 2006).

Nesse estudo será usada uma abordagem mais ampla para o câncer bucal, incluindo além da cavidade bucal, a orofaringe e laringe.

O tecido de origem das neoplasias malignas na cavidade oral é geralmente, o epitélio de revestimento mucoso, e por isso, cerca de 90% ou mais, se expressa como carcinoma epidermóide, também denominado como carcinoma de células escamosas, ou ainda, espinocelular, uma variante dos tumores epiteliais que acomete a camada estratificada escamosa (NEVILLE et al., 2009; DIAS et al., 2006).

O câncer bucal pode atingir qualquer área da cavidade oral, porém algumas localizações podem ser mais frequentes: lábio, língua, assoalho, palato duro, mucosa jugal e mucosa alveolar (GROMA et al., 2012; CERRI; BORDINI, 2003).

2.5.2. Epidemiologia do câncer bucal e de laringe

Os cânceres bucais correspondem a menos de 3% de todos os cânceres nos Estados Unidos, porém é o oitavo câncer mais comum em homens e o décimo quinto mais encontrado em mulheres. Mundialmente é o décimo primeiro câncer mais comum, com incidência alta principalmente no subcontinente indiano, Austrália, França, Brasil e África do Sul (OLIVEIRA et al., 2012; NEVILLE et al., 2009).

No Brasil estimou-se 9.990 casos novos de câncer da cavidade bucal em homens e 4.180 em mulheres para o ano de 2012. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10 casos novos a cada 100 mil homens e 4 casos novos a cada 100 mil mulheres. Figura 2.4A e 2.4B (INCA, 2011).

O câncer da cavidade bucal em homens é o quarto mais frequente na região Nordeste, 6 a cada 100 mil (6/100 mil). Nas regiões Sudeste (15/100 mil) e Centro-Oeste (9/100 mil), este câncer está na quinta posição, enquanto nas regiões Sul (12/100 mil) e Norte (3/100 mil), é o sexto mais frequente. Nas mulheres, é o oitavo mais frequente na região Nordeste (3/100 mil). Nas regiões Sudeste (6/100 mil) e Norte (2/100 mil), ocupa a nona posição, já nas regiões Centro-Oeste (3/100 mil) e Sul (3/100 mil), é respectivamente o 12º e o 15º mais incidente (INCA, 2011).

Figura 2.4- Representação espacial das taxas brutas de incidência de câncer bucal da cavidade oral por 100 mil homens, para o ano 2012, segundo Unidade da Federação. 2.4A para homens. 2.4B para mulheres. Inca, 2011.

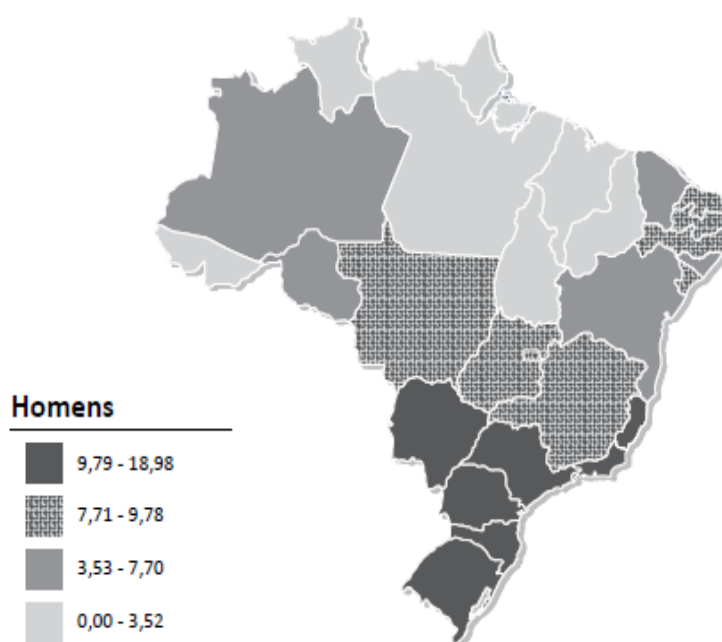


Figura 2.4A

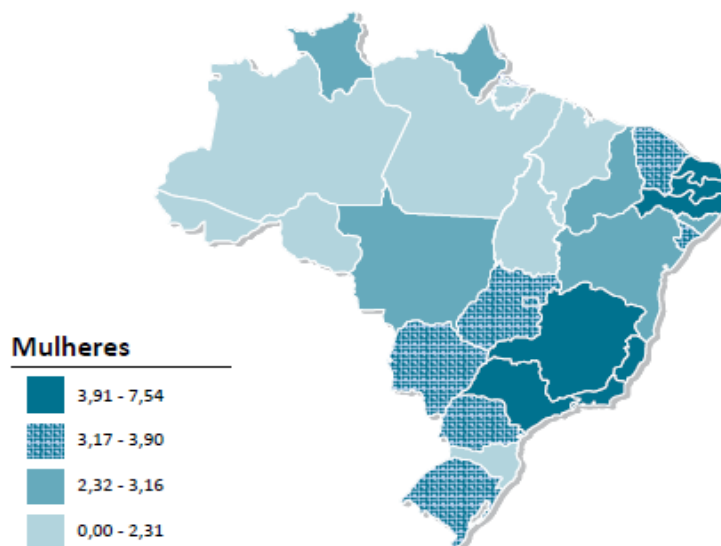


Figura 2.4B

Fonte: INCA, 2011.

Para o câncer de laringe, também incluído nesse estudo, esperam-se 6.110 casos novos para o ano 2012, com um risco estimado de 6 casos a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, em homens, o câncer de laringe é o sexto mais incidente na região Nordeste (4/100 mil). Nas regiões Sul (9/100 mil) e Norte (2/100 mil), ocupa a sétima posição, na região Sudeste (8/100 mil) a oitava e na região Centro-Oeste a nona posição (5/100 mil). A magnitude em mulheres é muito pequena, não sendo recomendado o cálculo de estimativa (INCA, 2011).

O câncer de laringe é o segundo câncer do aparelho respiratório no mundo, sendo o mais comum entre os diversos tipos de câncer da cabeça e do pescoço, representando 2% do total das neoplasias malignas. A mais recente estimativa mundial apontou a ocorrência de cerca de 129 mil casos por ano, sendo responsável pelo óbito de aproximadamente 70 mil pessoas por ano. Atualmente observa-se uma tendência no declínio da mortalidade pelo câncer de laringe em vários países, principalmente em países europeus. A incidência de câncer de laringe é maior em homens acima dos 40 anos de idade (INCA, 2011).

2.5.3. Etiologia do câncer bucal e de laringe

O câncer bucal é uma patologia de etiologia multifatorial associada a diversos condicionantes como a idade, gênero, raça, predisposição genética, nutrição, situação socioeconômica desfavorável e consumo de tabaco e álcool (PETTI, 2009; BOLOGNA-MOLINA et al., 2006).

Irritação mecânica crônica, como próteses dentárias mal ajustadas, câmaras de sucção destinadas a obter maior fixação de prótese dental, dentes fraturados e restos dentários não removidos constituem, ao longo dos anos, causas de lesões devidas a irritação constante e prolongada da mucosa bucal. Uma higiene bucal deficiente representa também um adicional de risco ao aparecimento do câncer de boca (JITOMIRSKI, 2008).

Em relação ao câncer de laringe também se consideram fatores de risco a inflamação crônica da laringe causada pelo refluxo gastroesofágico, exposição a produtos químicos, pó de madeira, fuligem ou poeira de carvão e vapores de tinta, além do álcool e tabaco (GAO et al., 2012; INCA, 2011).

Atualmente tem se colocado em evidência a implicação do HPV e EBV no desenvolvimento de lesões pré-cancerígenas e do carcinoma de células escamosas (CHAUDHARY et al., 2009; NEVILLE et al., 2009; ROMANOS et al., 2008; SIMONATO et al.; 2008; KOYAMA et al., 2007; KANSKY et al., 2006; BOLOGNA-MOLINA et al., 2006; PEREIRA DE LIMA; RABENHORST, 2006; LEITE et al., 2005).

O carcinoma de células escamosas da cavidade bucal é uma doença de maior ocorrência em indivíduos de meia-idade ou idosos. A faixa etária de 50-60 anos tem sido registrada como prevalente, apesar do aumento observado nos últimos anos em faixas etárias mais jovens (CERRI; BORDINI, 2003).

Indivíduos de cor clara, com pouca pigmentação melânica, são os que apresentam o maior risco de câncer de lábio, principalmente em associação a exposição à radiação solar (JITOMIRSKI, 2008).

Os hábitos e costumes são os grandes determinantes de risco para a ocorrência do câncer bucal, destacando-se o consumo do tabaco e do álcool. O álcool e o tabaco aumentam o risco dependendo da quantidade utilizada e estão relacionados a mais de 80% dos casos, sendo considerados agentes sinérgicos do risco (BOFFETTA; HASHIBE, 2006; SILVERMAAN JR et al., 2010).

O fumo (principalmente de cachimbo e charuto) é o principal fator de risco para o câncer de boca e de laringe. 80% dos portadores de câncer bucal são

fumantes. O efeito do fumo é potencializado pelo álcool, que aumenta a permeabilidade da mucosa a agentes carcinogênicos, embora sozinho ele seja substância de risco a formação do câncer bucal (INCA, 2011; DIAS et al., 2006; GERVÁSIO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003).

Segundo Cerri e Bordini (2003) e o Instituto do Câncer (2011) a condição socioeconômica parece exercer uma forte influência no aumento do risco para a ocorrência do câncer bucal e de laringe, já que as classes menos favorecidas não dispõem de recursos para a promoção e manutenção de sua saúde bucal, somando uma série de agravos (fatores irritativos crônicos), que exercem papel importante na carcinogênese.

Para Biazevic e Antunes (2006) o estudo da associação entre câncer bucal e privação social é complexo e sugere várias possibilidades. Por um lado, condições precárias de vida e trabalho podem se associar a exposição mais intensa aos fatores de risco. Por outro lado à estratificação social da doença pode também refletir padrões diferenciais de acesso a informações e serviços de saúde: geralmente os grupos populacionais mais submetidos a privação social recebem menos informações em saúde, são menos susceptíveis à mudança de comportamento, têm menos recursos terapêuticos, menor acesso a um diagnóstico precoce e pior prognóstico quando desenvolvem o agravo.

Apesar do avanço científico, que tem proporcionado melhores recursos tanto no diagnóstico como para o tratamento do câncer, esta doença continua sendo um dos grandes problemas de saúde pública, constituindo-se na segunda causa natural de morte nas regiões mais desenvolvidas no Brasil. Isto também é observado no câncer oral, já que, os casos são diagnosticados em estágios avançados, quando as possibilidades de cura são extremamente baixas (TORRES-PEREIRA, 2012; SOARES et al., 2005; CERRI; BORDINI, 2003; SOARES et al., 2002).

2.5.4. Diagnóstico do câncer bucal e de laringe

O diagnóstico precoce do câncer de boca costuma ser bastante dificultado por dois motivos: as lesões serem assintomáticas na fase inicial e os profissionais que examinam a boca raramente identificam as lesões (JITOMIRSKI, 2008).

Soares et al. (2002) afirmaram que o diagnóstico do câncer bucal é simples e deve ser precoce, pois sua evolução natural é rápida e num estágio avançado o tratamento fica impossibilitado, evoluindo para a morte do indivíduo ou ocasionando

sequelas estéticas ou funcionais do aparelho estomatognático. O diagnóstico tardio também resulta no maior custo do tratamento e prolongado tempo de internação hospitalar do paciente, onerando o sistema de saúde.

Para o diagnóstico precoce o cirurgião dentista deverá atentar para a história clínica do paciente e para a busca de lesões suspeitas, principalmente, as de maior potencial para a cancerização, como as eritroplasias, lesões vermelhas, e as leucoplasias, lesões brancas (DIAS et al., 2006).

Em estágios mais avançados da doença poderão ser encontrados sangramentos esporádicos, dor e mobilidade dental, dor reflexa no ouvido, limitação de movimentos mandibulares e ocorrência de nódulos cervicais. O agravamento da doença evolui ao sangramento em profusão e desnutrição do paciente (CERRI; BORDINI, 2003; DIAS et al., 2006; JITOMIRSKI, 2008).

Os sintomas mais comuns no câncer de laringe são a rouquidão duradoura e persistente. A dificuldade de engolir o alimento (disfagias) com alguma dor ou sensação de queimação pode ser outro sintoma do câncer de laringe, como também a dispneia ou falta de ar, halitose, perda de peso ou raramente, a dor de ouvido (INCA, 2011).

Em programas de saúde pública que contemplem o controle do câncer de boca e que envolva equipe multidisciplinar, outros profissionais, como o médico generalista, o assistente social, o enfermeiro e o pedagogo, podem contribuir na detecção de lesões precoces, principalmente através do estímulo do autoexame da cavidade bucal (DIAS et al., 2006).

Apesar da reconhecida soberania do exame clínico no diagnóstico das doenças, nenhuma conduta terapêutica nos casos de câncer bucal, deve ser realizada sem o procedimento da biópsia. A biópsia proporciona o conhecimento do grau de comprometimento no processo neoplásico, servindo de parâmetro para o plano de tratamento (CERRI; BORDINI, 2003).

2.5.5. Graduação histopatológica

Baseia-se no grau de diferenciação das células tumorais e no número de mitoses. O grau de diferenciação refere-se a maior ou menor semelhança das células tumorais com as células do tecido normal que pode ter-lhe originado. O número de mitoses expressa a atividade celular. Quanto maior a proliferação de um

tecido, maior será o número de mitoses verificadas (BRASIL, 2010; STRICKER; KUMAR, 2008).

A graduação dos tumores é determinada pela aparência citológica e é baseada na ideia de que o comportamento e a diferenciação estão relacionados, com tumores pouco diferenciados apresentando comportamento mais agressivo (STRICKER; KUMAR, 2008).

Em 1920, Broders propôs um sistema de classificação para o carcinoma de células escamosas de cavidade oral, revisado em 1925, que se fundamentou na relação entre células diferenciadas e indiferenciadas, classificando os tumores em quatro grupos: Grau I, II, III e IV. Grau I com 0 a 25% de células indiferenciadas, Grau II com 25 a 50% de células indiferenciadas, Grau III com 50 a 75% de células indiferenciadas e Grau IV com 75 a 100% de células indiferenciadas (LOURENÇO et al., 2007).

A atual classificação adotada pela Organização Mundial de Saúde (Quadro 2.1) permanece adotando como critério de classificação, o grau de diferenciação celular, mas agrupa os tumores em pouco, moderadamente e bem diferenciados. Para isso devem ser observadas características como ceratinização, pleomorfismo nuclear e celular, atividade mitótica e atipias celulares. Embora não estejam inseridos nessa classificação os parâmetros como tamanho, localização, padrão de invasão, invasão perineural e linfovascular são importantes para análise do prognóstico e sobrevida dos pacientes (LINDENBLATT et al., 2009; BARNES et al., 2005).

Quadro 2.1- Classificação adotada pela OMS para gradação histopatológica.

Gradação Histopatológica - OMS	
Parâmetros	Características
Pouco diferenciados	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses típicas e atípicas Mínima ceratinização
Moderadamente	Certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica Pouca ceratinização
Bem diferenciadas	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso.

Adaptado de Lourenço et al., 2007.

2.5.6. Estadiamento

O estadiamento do câncer baseia-se no tamanho da lesão primária, extensão de disseminação para linfonodos regionais e a presença ou ausência de metástases. Geralmente é baseada em exames clínicos e radiográficos e, em alguns casos, exploração cirúrgica. Pode ser clínico ou patológico. No Brasil utiliza-se o Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, onde T é a avaliação da dimensão do tumor primário (T0, T1, T2, T3 e T4), N é a extensão de sua disseminação para os linfonodos regionais (N0, N1, N2 e N3), M é a presença ou ausência de metástase à distância (M0 e M1) (BRASIL, 2010; NEVILLE et al., 2009; BRENER et al., 2007).

A determinação da extensão da doença e a identificação dos órgãos por ela acometidos constituem um conjunto de informações fundamentais para obtenção de informações sobre o comportamento biológico do tumor; seleção da terapêutica; previsão das complicações; obtenção de informações para estimar o prognóstico do caso; avaliação dos resultados do tratamento; investigação em oncologia: pesquisa básica e clínica e publicação dos resultados e troca de informações. Pacientes com mesmo tipo de câncer, mas com diferentes estadios, poderão receber diferentes tipos de tratamento (INCA, 2012; BRASIL, 2010).

2.5.7. Tratamento do câncer bucal e de laringe

Cerri e Bordini (2003) relataram que o adequado diagnóstico é de suma importância para a elaboração do tratamento. O tipo histológico, estadiamento e condições gerais do paciente, determinam o planejamento terapêutico mais indicado.

Entre os fatores que definem qual o tratamento de escolha estão a localização da lesão, o tipo histológico e a experiência do profissional. A remoção cirúrgica dos linfonodos como forma profilática é defendida por muitos e criticada por outros. O estadiamento e o estudo histopatológico são parâmetros adequados para a retirada das cadeias ganglionares. A situação geográfica do tumor na cavidade oral é fator determinante para o tratamento e prognóstico. Os cânceres localizados no assoalho da boca e na língua apresentam um maior número de insucesso e demandam um tratamento mais difícil do que os localizados no lábio (DIAS et al., 2006).

O estadiamento clínico da doença guia o tratamento dos carcinomas de células escamosas intraorais, que consiste na excisão cirúrgica ampla (radical), radioterapia ou na combinação de cirurgia e radioterapia. Os carcinomas da região de lábio geralmente são tratados com excisão cirúrgica, o carcinoma de células escamosas localizado no lábio superior é mais grave que o do lábio inferior, porém o carcinoma do lábio superior é menos frequente (NEVILLE et al., 2009).

As lesões de orofaringe geralmente recebem tratamento de radioterapia, assim como lesões com presença de margens cirúrgicas exíguas ou comprometidas, metástase regional, características histopatológicas de alto grau e invasão perineural ou angiolinfática. A quimioterapia é usada como terapia adjuvante nesses casos (NEVILLE et al., 2009).

A quimioterapia geralmente é administrada em conjunto com a radiação, como terapia de indução seguida por quimiorradioterapia concomitante ou como terapia paliativa (ALKAN et al., 2010; NEVILLE et al., 2009).

A cirurgia, apesar de eventuais mutilações, é o tratamento de escolha sempre que possível, uma vez que as consequências sistêmicas são menos comprometedoras que a quimioterapia ou radioterapia, que geralmente provocam mucosites, osteoradionecrose, alopecia entre outras complicações. Em lesões pequenas, contudo, não é raro o uso exclusivo da radiação. Embora os agentes quimioterápicos possam temporariamente reduzir o tamanho de um aumento de volume tumoral, nenhum deles tem melhorado as taxas de sobrevida significativamente (REGEZI et al., 2008; CARVALHO, 1997; TOMMASI, 1997).

A dimensão do tumor também influencia no tratamento escolhido, assim em carcinomas intraorais pequenos, uma única modalidade de tratamento é escolhida. Pacientes com lesões maiores ou com lesões que apresentem linfonodos clinicamente palpáveis requerem terapia combinada. Paciente com carcinoma de língua em estágio inicial (T1/T2 e N0), mas profundamente invasivos (espessura maior de 3 ou 4 mm) tem risco aumentado para metástase subclínica para linfonodo e devem receber irradiação pós-operatória em pescoço ou dissecação de pescoço eletiva. Na suspeita de metástase local para linfonodos, uma dissecação radical ou radical modificada deve ser realizada no pescoço (ALKAN et al., 2010; NEVILLE et al., 2009).

É essencial que o tratamento e preservação do câncer bucal, seja realizado por uma equipe multidisciplinar, envolvendo o cirurgião dentista (CD), o oncologista,

o cirurgião, o radioterapeuta e áreas afins. Por mais incipiente que seja o câncer, ele deve ser controlado periodicamente através de exame clínico e complementares, se necessário (CERRI; BORDINI, 2003).

O tratamento do câncer de laringe assim como o bucal também varia de acordo com a localização e a extensão do câncer. Pode-se realizar cirurgia e/ou radioterapia ou quimioterapia associada à radioterapia. Diagnóstico precoce é importante para evitar deformidades físicas e problemas psicossociais que podem advir da perda da fala quando da realização de laringectomia total (INCA, 2012).

2.6. PREVALÊNCIAS DE HPV E EBV EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS DE CÂNCER BUCAL E DE LARINGE.

2.6.1. Prevalência de HPV em estudos

Snijders et al. (1996) analisaram a prevalência do HPV em 63 carcinomas de células escamosas em diferentes sítios anatômicos de cabeça e pescoço através de PCR. O DNA do HPV foi detectado em 20,6% dos casos. PCR específico para os subtipos 6, 11, 16, 18, 31 e 33 do HPV demonstraram a presença do HPV 16 sozinho nestes carcinomas. O HPV 16 também foi encontrado no epitélio normal em áreas marginais da maioria dos casos HPV positivos dos carcinomas de células escamosas.

Estudo realizado por Giovannelli et al. em 2006, comparou a frequência de HPV em pacientes com lesões potencialmente malignas e lesões malignas na cavidade oral através de escovação da mucosa oral normal adjacente a lesão e nas lesões. Foram selecionados 50 pacientes com leucoplasia oral, 49 com líquen plano oral (lesões potencialmente malignas) e 17 com carcinoma de células escamosas orais (lesão maligna). O DNA de HPV foi encontrado em 22% nas lesões e em 16% nas áreas adjacentes de leucoplasia oral; em 24,5% e 22,4% nas lesões e áreas adjacentes de líquen plano oral respectivamente e 35,3% e 41,2% nas lesões e áreas adjacentes de carcinoma de células escamosas respectivamente.

Xavier et al. (2007) em estudo piloto verificaram a frequência de aparecimento do HPV na cavidade oral em 10 homens com HPV anogenital positivo, através de PCR e estudo histológico. Todos os pacientes apresentaram exame macroscópico normal da cavidade oral e a biologia molecular para HPV foi negativa para todos.

Simonato et al. (2008) investigaram a presença de HPV em 29 espécimes emblocadas em parafina de carcinomas de células escamosas de assoalho de boca e verificaram a prevalência de HPV em 17,2%, utilizando *nested* PCR.

González-Losa et al. (2008) verificaram a prevalência de HPV de alto risco em 77 indivíduos com mucosa oral normal através de captura híbrida 2, em Yacatan, México e apenas uma amostra (1,2%) foi positiva para HPV de alto risco.

Gheit et al. (2009) realizaram estudo na Índia Central com o objetivo de determinar a prevalência de 19 tipos do HPV (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73 e 82) no câncer cervical, vulva, vagina, pênis e oral. Foi encontrada prevalência de 27,5% de HPV16 no câncer oral. Outros tipos de HPV não foram encontrados no câncer oral.

A frequência do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio de PCR foi analisada por Esquenazi et al. (2010). Cem indivíduos na faixa etária de 20 a 31 anos, estudantes universitários, sem história, queixas ou lesões visíveis ao exame físico de cavidade oral e orofaringe tiveram material da mucosa oral coletado por raspado com escova e analisados através de PCR. Os resultados demonstraram ausência de HPV em todas as amostras.

2.6.2. Prevalência de EBV em estudos

Kobayashi et al. (1999) avaliaram a prevalência do EBV no carcinoma oral de células escamosas através da reação em cadeia da polimerase (PCR), hibridização *Southern blot* e hibridização *in situ* (HIS). O DNA do vírus Epstein-Barr foi detectado em 15,2% (7) das 46 amostras estudadas por uma combinação da PCR e hibridização *Southern blot*. Todas as amostras positivas mostraram carcinoma bem diferenciado, sugerindo uma possível relação entre a infecção pelo EBV e o grau de diferenciação do tecido do carcinoma. Nenhum sinal de pequenas moléculas de RNA (EBER-1) foi demonstrado pela hibridização *in situ*. Não foi observada relação significativa entre a infecção pelo EBV e metástase linfática.

Ikuta et al. (2000) efetuaram a detecção do EBV na garganta de 48 adultos e saliva de 93 crianças saudáveis no Japão através de esfregaço. O EBV foi encontrado em 90% (43) na garganta de adultos e em 38% (35) na saliva das crianças. A prevalência de EBV na saliva das crianças aumentava com a idade. Nos adultos o EBV 1 foi encontrado em 86%, o EBV 2 em 2% e 10% apresentaram ambos os tipos. Nas crianças 94% e 6% pertenciam ao tipo 1 e 2 respectivamente.

Ammatuna et al. (2001) verificaram a prevalência de HPV, EBV e citomegalovírus na mucosa oral normal de 57 pacientes infectados por HIV e 40 transplantados renais. 30 pacientes saudáveis foram utilizados como controles. EBV foi identificado em 42,1% dos pacientes HIV positivos, em 65% dos transplantados renais e 16,6% do grupo controle. O HPV foi detectado em 7,0% dos HIV, 20,0% em transplantados e 3,3% do grupo controle.

Higa et al. (2002) realizaram estudo para verificar os subtipos de EBV em carcinomas de células escamosas oral em Okinawa, ilha subtropical no sul do Japão, comparando com os subtipos encontrados em Kitakyushu e Kumamoto no continente do mesmo país. Em Okinawa, de 54 pacientes estudados 39 estavam infectados por EBV, sendo 25 por EBV 1, 06 por EBV 2 e 08 por ambos os vírus. No continente japonês de 41 casos, 10 foram positivos para EBV, com 09 casos de EBV 1 e 01 caso de EBV 2.

Bagan et al. (2008) analisaram a presença do EBV em vinte pacientes acometidos de leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma oral de células escamosas em biópsias submetidas a PCR. O EBV foi encontrado em 60% dos pacientes com leucoplasia verrucosa proliferativa e em 40% dos casos de carcinoma oral de células escamosas.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Verificar a prevalência do *Papilomavírus humano* (HPV) e do vírus Epstein-Barr (EBV) na mucosa oral normal e acometida com neoplasias orais e de laringe.

3.2. ESPECÍFICOS

- Verificar os tipos mais prevalentes de HPV 6, HPV 11, HPV 16, HPV 18, HPV 31, HPV 33, HPV 35, HPV 52 e HPV 58 na cavidade oral em condições normais e na presença de lesões da cavidade oral e laringe.

- Verificar os tipos mais prevalentes de EBV (EBV 1 e EBV 2) na cavidade oral em condições normais e na presença de lesões da cavidade oral e laringe.

- Correlacionar a localização do carcinoma na cavidade oral com a presença de HPV e EBV.

- Correlacionar a infecção por HPV e EBV entre homens e mulheres no estado do Pará.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO:

Este estudo caracteriza-se como um estudo transversal analítico.

4.2. SELEÇÃO DE CASOS

Para este estudo foram estabelecidos dois grupos:

4.2.1. Grupo 1: composto de espécimes emblocados em parafina, com diagnóstico confirmado de carcinoma epidermóide bucal e laringe. Grupo constituído a partir de pacientes atendidos no Hospital Ophir Loyola na cidade de Belém, que funciona com referência terciária ao atendimento de câncer no estado do Pará.

Foram selecionados 70 blocos parafinados de pacientes com diagnóstico confirmado de carcinoma epidermóide bucal e de laringe acompanhados de ficha clínica com o maior número de informações possíveis. Apesar de três fichas incluídas neste estudo não apresentarem os dados de identificação completos dos pacientes as mesmas foram incluídas por apresentarem os dados relativos ao diagnóstico histopatológico registrado.

4.2.2. Grupo 2: composto de raspado bucal de 166 indivíduos sem presença de lesões na cavidade bucal. O grupo foi selecionado nas clínicas de atendimento da Faculdade de Odontologia e no Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará e em consultório odontológico particular pela pesquisadora responsável. Para padronização dos exames todas as amostras foram colhidas pela pesquisadora.

Critérios de inclusão para o estudo:

a- Blocos parafinados: diagnóstico confirmado de carcinoma de células escamosas bucal e de laringe, de indivíduos de ambos os gêneros de 18 a 92 anos de idade, acompanhado de dados clínicos das lesões, obtidos a partir de informações contidas nas fichas clínicas ou de requisição para exame anatomopatológico tais como: idade, gênero, raça, profissão, estado civil, fatores predisponentes, localização anatômica da lesão, diâmetro da lesão, aspecto da lesão, estadiamento, TNM, diagnóstico clínico, diagnóstico histopatológico e tratamento (Apêndice A) e concordância do indivíduo em participar do estudo.

b- Raspado bucal: indivíduos com mais de 18 anos, que concordaram em participar do estudo após informados dos seus objetivos e que não apresentavam lesões na cavidade bucal no momento do exame.

Para estes indivíduos foi utilizada ficha clínica com os seguintes dados: idade, gênero, raça, local de colheita do material, presença de cárie, doença periodontal e uso de álcool e fumo (Apêndice B).

A não observância de um dos critérios acima implicou na exclusão do material biológico ou do indivíduo.

4.3. ANÁLISE LABORATORIAL

4.3.1. Identificação do HPV e EBV

A análise laboratorial para identificação viral foi realizada através da técnica de PCR (Reação em Cadeia de Polimerase), no Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical.

4.3.1.1. Isolamento do DNA

a-Grupo 1: Amostras de carcinoma de células escamosas

Para os casos confirmados de câncer, o DNA foi obtido de amostras teciduais parafinadas. Inicialmente, com o auxílio de uma navalha estéril, 10 micrômetros de material foi retirado, colocado em microtubo de 1,5 mL e submetido a extração de DNA pelo kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue kit da Qiagen. Após a extração do DNA a amostra foi amplificada através do kit REPLI-g[®] da QIAGEN.

a.1- Extração de DNA pelo kit QIAamp[®] DNA FFPE Tissue kit da Qiagen:

- No microtubo contendo o corte foi adicionado 1 mL de xilol. O microtubo era fechado, levado ao vortex por 10 segundos e centrifugado em velocidade de 13.000 rpm por 2 minutos a 20°C. Removia-se o sobrenadante por pipetagem cuidadosamente e 1 mL de etanol 96-100% era adicionado no pellet e misturado no vortex com centrifugação a 13.000 rpm por 2 minutos em 20°C. Outra remoção do sobrenadante por pipetagem era realizada, seguida de incubação a temperatura ambiente, mantendo o tubo aberto, por 10 minutos ou até todo o etanol residual evaporar.

- O pellet era ressuscitado em 180 µL de buffer ATL com adição de 20 µL de proteinase K e agitação no vortex, seguida de incubação a 56°C por 1 hora ou até a amostra lisar completamente. Nova incubação a 90°C por 1 hora era realizada com mais uma centrifugação a 1 minuto por 15°C por 11.000 rpm.

- A seguir eram colocados 200 μ L buffer AL e o microtubo levado ao vortex, era efetuada a adição de 200 μ L de etanol e procedida agitação no vortex e rápida centrifugação.

- O conteúdo do microtubo era transferido para a coluna e centrifugado a 1 minuto por 8.000 rpm, em seguida procedia-se a troca do tubo coletor e adicionava-se 500 μ L de buffer AW1 na mistura seguido de centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. Nova troca do tubo coletor era executada e 500 μ L de buffer AW2 adicionado com outra centrifugação por 1 minuto a 8.000 rpm. O tubo coletor era removido e uma centrifugação seca por 3 minutos a 13.00 rpm executada.

- A coluna era transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril e 50 μ L de buffer ATE adicionado na coluna, que era fechada e incubada por 1 minuto a 15-25°C e posterior centrifugação por 1 minuto em velocidade máxima para a obtenção do DNA e armazenamento a - 20°C.

a.2- Amplificação da amostra através do kit REPLI-g[®] da QIAGEN.

- Inicialmente preparou-se o Buffer D1 e N1 nas seguintes concentrações:

- Buffer D1: 0,50 μ L de DLB e 2 μ L água para cada reação.

- Buffer N1: 0,75 μ L de stop solution e 4,25 μ L de água cada reação.

- Em microtubo de 1,5 ou 0,5 mL foi colocado 2,5 μ L de DNA e 2,5 μ L de Buffer D1, com agitação no vortex e centrifugação rápida.

- A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 3 minutos e 5,0 μ L de Buffer N1 adicionado na amostra com agitação no vortex e centrifugação rápida.

- A seguir ocorria o preparo do Master Mix usando 29 μ L de Buffer reaction, 1 μ L de DNA polimerase e 10 μ L de água para cada reação. 40 μ L do Master Mix eram adicionados em 10 μ L do DNA desnaturado, com incubação a 30° por 08 a 16 horas e posterior incubação a 65° por 3 minutos.

b- Grupo 2: Amostra de raspado bucal

Para obtenção de DNA de indivíduos sem presença de lesões na cavidade bucal foi coletado o material através de raspado com escova estéril (kit para coleta de colpocitologia oncótica) da mucosa do vestibulo da boca bilateralmente, superfície dorsal e ventral de língua, palato duro e palato mole e assoalho bucal (XAVIER et al., 2007).

Antes de efetuar o raspado o participante da pesquisa bochechava quatro vezes 10 mL de solução de água destilada para promover a limpeza da cavidade oral, quando então o raspado era efetuada e a escova mergulhada a seguir em um

tubo cônico de 15 mL, contendo 3 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato). Em seguida centrifugava-se o tubo a 2000 rpm por 5 minutos para a precipitação das células, sendo o sobrenadante desprezado e as células ressuspensas em 5 mL de PBS. Nova centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos era executada, com o sobrenadante desprezado outra vez e ressuspensas em 400 µL de PBS e transferido para um microtubo de 1,5 mL para armazenamento a -20°C.

O DNA foi extraído utilizando o kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen) obedecendo os seguintes passos:

- Em um microtubo de 1,5 mL colocava-se 200 µL da amostra e adicionado 20 µL de proteinase K e 20 µL de RNase A, sendo então agitado no vortex e incubado a temperatura ambiente por dois minutos.

- A seguir adicionava-se 200 µL Purelink Genomic Lysis/Binding Buffer e o microtubo levado ao vortex para homogeneizar, com incubação a 55°C por dez minutos.

- Após incubação adiciona-se 200 µL de etanol a 96-100% agitava-se no vortex por 5 segundos. O conteúdo era então transferido do microtubo para a coluna existente no kit e centrifugado a 10.000 rpm por um minuto a temperatura ambiente, realizando em seguida troca do tubo coletor e lavagem do DNA adicionando 500 µL de wash buffer 1. A coluna era centrifugada a 10.000 rpm por um minuto, com nova troca do tubo coletor e adição de 500 µL de wash buffer 2 e centrifugação por três minutos a velocidade máxima.

- O tubo coletor era descartado e a coluna transferida para um microtubo de 1,5 mL estéril para eluição, utilizando 100 µL de PurelinK Genomic Elution buffer na coluna com incubação a um minuto na temperatura ambiente, seguida de centrifugação a velocidade máxima por um minuto. O DNA genômico purificado era congelado a -20°C.

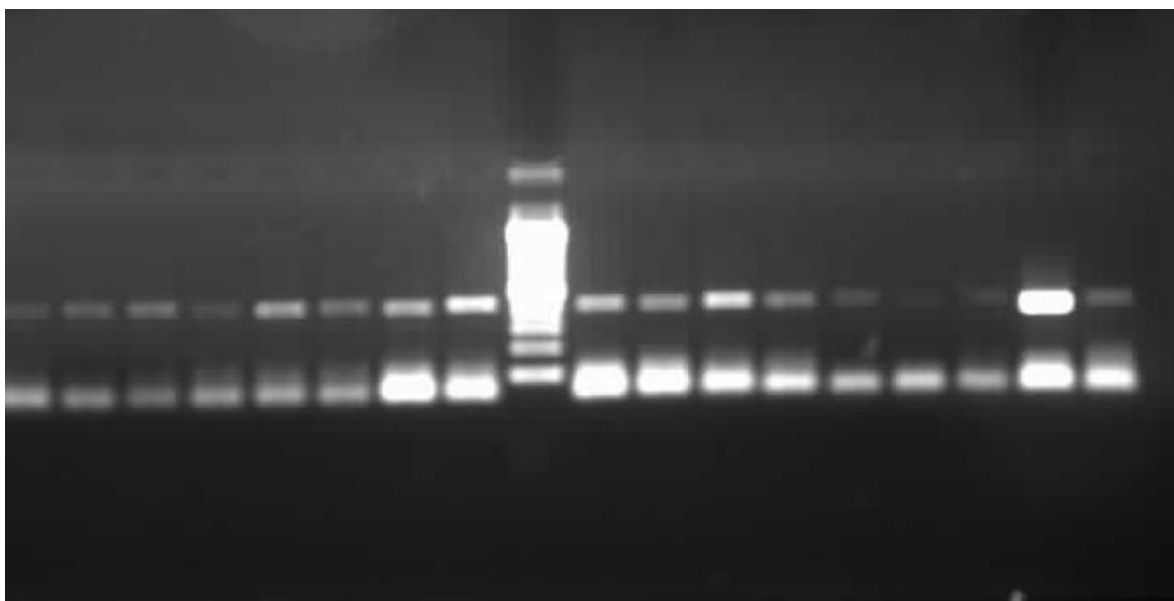
4.3.1.2. PCR para detecção e sub-tipagem de HPV e EBV:

a) Para pesquisa de HPV foram utilizados dois procedimentos de PCR: PCR 1 para a detecção do DNA viral e PCR 2 para a tipagem. As amostras positivas para HPV foram tipadas para os vírus dos tipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58.

PCR 1: Realizada de forma convencional em termociclador Eppendorf, utilizando o GoTaq® Green Master Mix da Promega. Para cada reação foi utilizado 10 µL de Mix, 8,2 de água e 0,8 µL de oligos, *MY9* e *MY11* (específicos para detecção de HPV) e 1,0 µL de DNA. A reação foi padronizada com um ciclo de

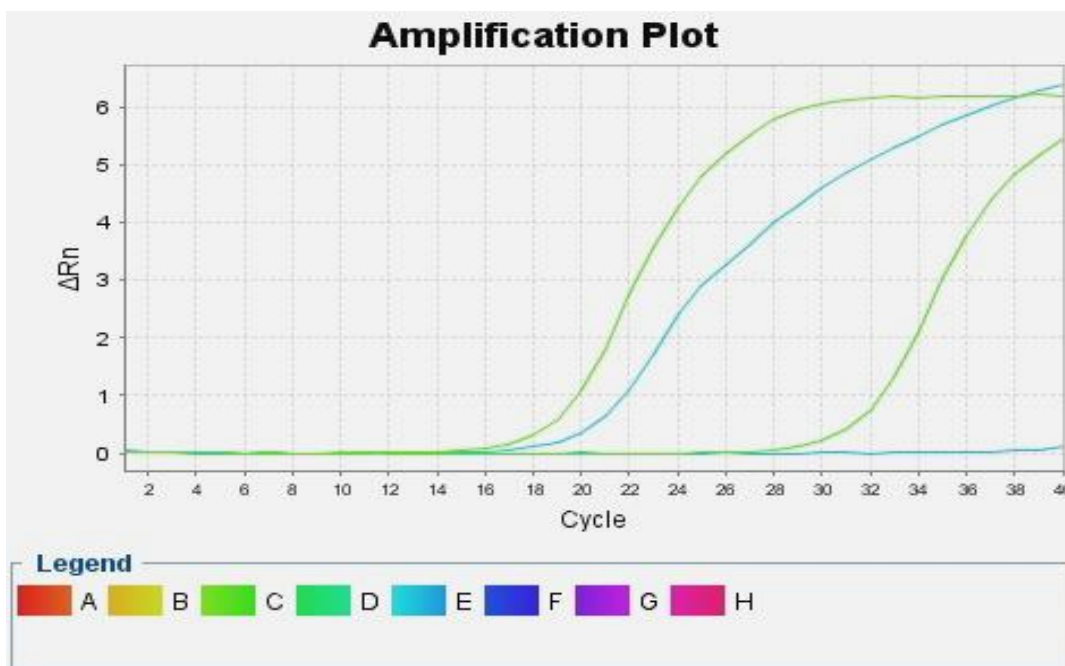
desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos e 40 ciclos da amplificação de PCR. Cada ciclo consistiu de desnaturação em 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final ocorreu à 72°C por 5 minutos e a reação era mantida a temperatura de 10°C. Em seguida as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE. As amostras positivas apresentaram uma banda de 440 bp (Figura 4.1). Em caso de dúvida a amostra foi submetida a nova PCR com os oligos GP5-GP6, nas mesmas condições descritas anteriormente, com as amostras positivas apresentando 250 bp.

Figura 4.1- Gel em agarose para detecção do HPV. 440 bp.



PCR 2: foi feita por PCR em tempo real no aparelho StepOnePlus da Applied Biosystems, utilizando sondas específicas e *kit Platinum® qPCR SuperMix-UDG* (Invitrogen). Para cada amostra foi utilizado 10,0 µL de mix, 1,0 µL de DNA, 0,5 µL oligo iniciador, 0,2 µL de ROX Dye, 0,2 µL de magnésio e 8,1 µL água Milli Q autoclavada qsp, totalizando 20 µL de reação. Foram executados 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos e anelamento e extensão por 30 segundos. Ao final foi realizado o protocolo de dissociação térmica, para controle de qualidade da reação. Os resultados foram analisados pelo ABI 7000 SDS software (Figura 4.2).

Figura 4.2 - Curva de amplificação para HPV 58

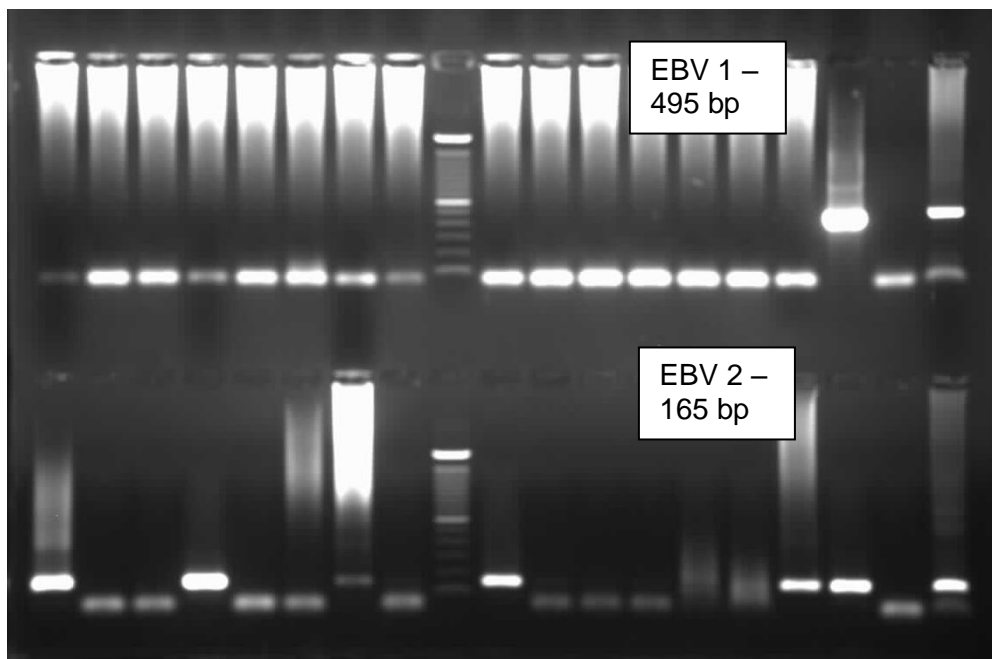


b) Para pesquisa de EBV também foram utilizados dois procedimentos de PCR: PCR 1 para a detecção do DNA viral e PCR 2 para a tipagem. Ambas de forma convencional em termociclador Eppendorf. As amostras positivas para EBV foram tipadas para os vírus dos tipos 1 e 2.

PCR 1: Realizada utilizando o GoTaq® Green Master Mix da Promega. Para cada reação foi utilizado 10 μ L de Mix, 8,2 de água e 0,8 μ L de oligos, *EBNA2* (específicos para detecção de EBV) e 1,0 μ L de DNA. A reação foi padronizada com um ciclo de desnaturação inicial de 94°C por 3 minutos e 45 ciclos da amplificação de PCR. Cada ciclo consistiu de desnaturação em 94°C por 30 segundos, anelamento a 56,8°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final ocorreu à 72°C por 7 minutos e posteriormente mantido a 4°C. Em seguida as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2,0% em TBE. As amostras positivas teriam de apresentar 596 bp.

PCR 2: Para tipagem de EBV 1 e 2 foi realizada PCR nas mesmas condições utilizadas na PCR1 para EBV, com oligos específicos para EBV 1 e EBV 2. As amostras positivas para EBV 1 deveriam apresentar 496 bp e EBV 2 165 bp (Figura 4.3).

Figura 4.3- Gel em agarose pra detecção de EBV 1 e EBV 2.



Para controle da presença de DNA nas amostras e para avaliar se não há inibidor de reação, todas as amostras foram submetidas a PCR, nas mesmas condições usadas para detecção de HPV, para β globina, que é um gene constitutivo e deve amplificar todas as amostras (269 bp). Para evitar contaminação com DNA estranho foram utilizados ambientes independentes para cada uma das etapas: extração do DNA, preparação do mix, procedimento da PCR e eletroforese.

Todas as reações foram realizadas utilizando um controle positivo (amostra reconhecidamente positiva para o vírus) e um controle negativo para PCR 1 e dois controles negativos, no caso de PCR em tempo real, a fim de estabelecer a confiabilidade da reação.

Oligos selecionados:

β globina:

F: GAA GAG CCA AGG ACA GGT AC

R: CAA CTT CAT CCA CGT TCA CC

Oligos gerais para HPV:

MY09: 5'-CGT CCA AAA GGA AAC TGA GC-3'

MY11: 5'-GCA CAG GGA CAT AAC AAT GG-3'

GP5: 5' TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC' 3

GP6: 5' GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C' 3

Sondas para tipagem de HPV:

Para tipagem de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58 foram desenvolvidas sondas específicas no Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará pela Profa. Dra. Hellen Fuzii.

Oligos para EBV (Wu et al., 2007):

Oligos externos:

5'-AGG GATG CCT GGA CAC AAG A-3'

5'-TGG TGC TGC TGG TGG TGG CAA-3'

Oligos internos:

EBV-1: 5'-TCT TGA TAG GGA TCC GCT AGG ATA-3'

5'-ACC GTG GTT CTG GAC TAT CTG GAT C-3'

EBV-2: 5'-CAT GGT AGC CTT AGG ACA TA-3'

5'-AGA CTT AGT TGA TGC TGC CCT AG-3'

4.4. ASPECTOS ÉTICOS

Este projeto seguiu as normas da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, relativa à pesquisa em seres humanos, que torna necessária à aprovação do protocolo de pesquisa por um Comitê de Ética em Pesquisa Institucional.

Além disso, por se tratar de pesquisa envolvendo material biológico e também o exame bucal de seres humanos para coleta de material para exame de biologia molecular, tal procedimento pressupõe a utilização do consentimento livre e esclarecido, conforme explicitado no capítulo IV da Resolução CNS 196/96 (BRASIL, 2009).

No termo de consentimento (Apêndice C, para material biológico e Apêndice D para grupo controle), foram esclarecidas a utilização do material biológico, as características do exame bucal e colheita de material a ser realizado, o sigilo dos dados obtidos e a livre decisão de participação do indivíduo. Foi exigido que todos

os participantes da amostra autorizassem a sua participação no estudo através de assinatura ou identificação por impressão dactiloscópica.

4.4.1. Riscos e benefícios

Os riscos da pesquisa foram considerados mínimos. Em relação ao risco físico, o exame realizado no grupo controle não causou nenhuma dor nem risco de biossegurança. No caso do material biológico não foi necessário mais nenhum procedimento clínico que pudesse causar risco físico a este grupo de estudo, pois o material já tinha sido colhido.

Os riscos psicológicos também foram mínimos. Para minimizá-los os participantes da pesquisa tinham a garantia de que as informações obtidas seriam analisadas com a preocupação de evitar a identificação dos mesmos e que eles teriam a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo.

A participação dos envolvidos não trouxe qualquer benefício direto aos mesmos, mas proporcionou um melhor conhecimento sobre a relação dos vírus estudados com o câncer de boca e de laringe.

Não ocorreram despesas ou compensações pessoais para os participantes da pesquisa em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não houve compensação financeira relacionada à participação. As despesas adicionais foram absorvidas pelo orçamento da pesquisa.

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Núcleo de Medicina Tropical da Universidade Federal do Pará e aprovado através do Parecer nº 008/2009 (Anexo A).

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os dados obtidos foram registrados em um banco de dados elaborado no Programa Excel (Windows, Microsoft®), também utilizado para realização de gráficos e tabelas.

A análise estatística foi realizada por meio do *software* BioEstat 5.0. O teste exato de Fischer, o teste G e o Qui-quadrado foram utilizados para verificar a significância estatística da presença do HPV e do EBV nos grupos raspado bucal e grupo de casos confirmados de câncer. O nível de significância adotado foi de 5% ($\alpha = 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. INDIVÍDUOS ACOMETIDOS POR CÂNCER BUCAL E DE LARINGE.

5.1.1. Caracterização da amostra

Entre os 70 indivíduos com diagnóstico confirmado de câncer bucal, 88,6% (n=62) da amostra apresentava mais de 50 anos, assim distribuído: 25,7% (n=18) tinham de 50 a 59 anos, 24,3% (n=17) de 60 a 69 anos e 31,5% (n=22) de 70 a 79 anos. 7,1% (n=5) possuíam mais de 70 anos e apenas 7,1% apresentavam menos de 50 anos (n=5) (Tabela 5.1). A idade média da amostra foi de 64,8 com desvio padrão de 12,4. A mediana encontrada foi de 64 anos.

Cinquenta e oito pacientes (82,8%) eram homens e 12,9% (9 pacientes) mulheres. Em relação à cor da pele 24,3% (n=17) eram negros, 18,6% (n=13) pardos, 42,8% (n=30) brancos. Quando analisado o estado civil dos pacientes 14,3% eram solteiros (n=10), 42,8% (n=30) casados, 8,6% (n=6) viúvos e 34,3% (n=24) estavam incluídos entre outros e não informados.

Tabela 5.1- Caracterização dos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe segundo faixa etária, gênero, cor da pele e estado civil.

Caracterização	n	%
Faixa etária		
18 ---50	5	7,1
50 ---60	18	25,7
60 ---70	17	24,3
70 ---80	22	31,5
80 ou mais	5	7,1
Não informada	3	4,3
Sexo		
Feminino	9	12,9
Masculino	58	82,8
Não informado	3	4,3
Cor da pele		
Negro	17	24,3
Pardo	13	18,6
Branco	30	42,8
Não informada	10	14,3
Estado civil		
Solteiro	10	14,3
Casado	30	42,8
Viúvo	6	8,6
Outros	20	28,6
Não informado	4	5,7
Total	70	100,0

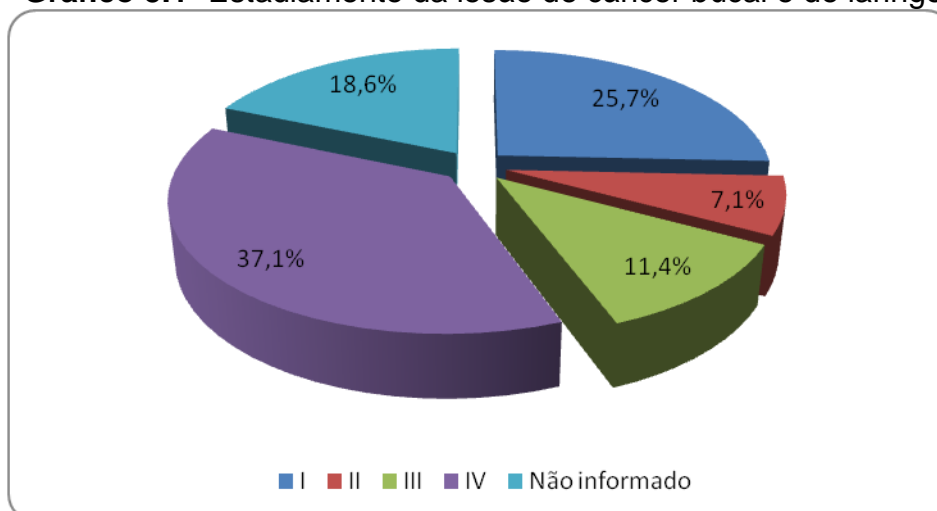
Quanto à localização da lesão de câncer bucal e de laringe (Tabela 5.2), 41,5% (n=29) das lesões estavam localizadas na laringe e 58,5% (n=41) distribuídas em áreas da cavidade oral. Das lesões localizadas na cavidade oral foram predominantes as lesões envolvendo o palato (20,0%, n=14), a língua (12,9%, n=9) e o assoalho bucal (4,3%, n=3).

Tabela 5.2- Localização da lesão de câncer bucal e de laringe.

Local	n	%
Assoalho	3	4,3
Orofaringe	2	2,9
Laringe	29	41,5
Língua	9	12,9
Maxila	1	1,4
Hipofaringe	1	1,4
Palato	10	14,3
Palato mole	3	4,3
Lábio	1	1,4
Lábio Superior	1	1,4
Lábio Inferior	1	1,4
Boca	5	7,2
Língua e orofaringe	1	1,4
Oro e hipofaringe	1	1,4
Palato e seio	1	1,4
Retromolar	1	1,4
Total	70	100,0

Das lesões que tiveram o estadiamento realizado e informado nas fichas clínicas 37,1% (n=26) se encontravam no estadio IV, 11,4% (n=8) no estadio III, 7,1% (n=5) no estadio II e 25,7% (n=18) no estadio I (Gráfico 5.1). Treze lesões (18,6%) não tiveram seu estadiamento registrado.

Gráfico 5.1- Estadiamento da lesão de câncer bucal e de laringe.



A relação entre o grau de estadiamento e a idade pode ser observada nas Tabelas 5.3 e 5.4. O estadiamento IV foi o mais registrado de 30 a 79 anos. Nos indivíduos de 80 ou mais anos de idade os graus I e II foram predominantes. Teste G foi realizado para as duas relações com p-valor de 0,20 para o estadiamento de lesão de câncer com a faixa etária e de 0,30 para o estadiamento do câncer em relação à idade mediana.

Tabela 5.3- Estadiamento da lesão de câncer bucal e de laringe em relação às faixas etárias.

Idade	Estadio										Total	
	I		II		III		IV		Não informado			
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
30 ---50	1	5,6	0	0,0	1	12,5	3	11,5	0	0,0	5	7,1
50 ---60	4	22,2	1	20,0	1	12,5	8	30,8	4	30,8	18	25,7
60 ---70	4	22,2	1	20,0	4	50,0	6	23,1	2	15,3	17	24,3
70 ---80	7	38,9	1	20,0	2	25,0	8	30,8	4	30,8	22	31,4
80 ou mais	2	11,1	2	40,0	0	0,0	1	3,8	0	0,0	5	7,1
Não informada	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	23,1	3	4,3
Total	18	100,0	5	100,0	8	100,0	26	100,0	13	100,0	70	100,0

Probabilidade do teste G, $p=0,20$.

Tabela 5.4- Estadiamento da lesão de câncer bucal e de laringe segundo idade mediana.

Estadio	Idade*				Total	
	<65 anos		≥65 anos			
	n	%	n	%	n	%
I	6	17,6	12	36,3	18	26,9
II	2	5,9	3	9,1	5	7,5
III	6	17,6	2	6,1	8	11,9
IV	15	44,2	11	33,3	26	38,8
Não informado	5	14,7	5	15,2	10	14,9
Total	34	100,0	33	100,0	67	100,0

*3 indivíduos não tiveram a idade informada. Probabilidade do teste G, $p=0,30$.

Quando observada a associação dos tratamentos realizados (Tabela 5.5) de maneira geral a maioria dos pacientes recebeu tratamento cirúrgico, quer de forma isolada (28,8%, $n=20$) ou em combinação com outras terapias (24,2%, $n=17$). A terapia combinada de cirurgia + radioterapia + quimioterapia foi realizada em cinco (7,1%) pacientes, terapia com radioterapia + quimioterapia foi observada em 17,1% ($n=12$).

Tabela 5.5- Associação de tratamentos realizados nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.

Tipo de tratamento	Localização do Câncer				Total	
	Bucal		Laringe		n	%
	n	%	n	%		
Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia	2	4,9	3	10,3	5	7,1
Cirurgia + Radioterapia + Suporte Clínico	1	2,4	1	3,4	2	2,9
Cirurgia + Quimioterapia	1	2,4	0	0,0	1	1,4
Cirurgia + Suporte Clínico	1	2,4	4	13,8	5	7,1
Cirurgia + Radioterapia	4	9,8	0	0,0	4	5,7
Cirurgia	10	24,4	10	34,6	20	28,8
Paliativo + Radioterapia	1	2,4	0	0,0	1	1,4
Radioterapia	2	4,9	2	6,9	4	5,7
Radioterapia + Quimioterapia	8	19,5	4	13,8	12	17,1
Suporte Clínico	2	4,9	2	6,9	4	5,7
Não informado	9	22,0	3	10,3	12	17,1
Total	41	100,0	29	100,0	70	100,0

Probabilidade do teste G, $p=0,20$.

Quando relatada em prontuário, a letalidade dos pacientes envolvidos no estudo foi de 20% ($n=14$), sendo 19,5% ($n=8$) em câncer bucal e de laringe e 20,7% ($n=6$) em laringe. Cinquenta e um indivíduos (72,9%) permaneciam sem registro de óbito (Tabela 5.6).

Tabela 5.6- Óbitos em indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.

Óbito	Bucal		Laringe		Total	
	n	%	n	%	n	%
Sim	8	19,5	6	20,7	14	20,0
Não	28	68,3	23	79,3	51	72,9
Não informado	5	12,2	0	0,0	5	7,1
Total	41	100,0	29	100,0	70	100,0

Probabilidade do teste G, $p=0,06$.

A frequência do óbito relacionado com a faixa etária e a mediana estão representadas nas Tabelas 5.7 e 5.8.

O óbito foi mais frequente nas faixas etárias de 50 a 59 anos e 70 a 79 anos (35,7%, $n=5$ em cada faixa etária), não havendo associação estatística ($p=0,36$).

Quando relacionado o óbito com a mediana (64 anos) a maior frequência foi observada nos indivíduos com menos de 65 anos (23,5%, $n=8$). Também não houve associação estatística entre óbito e mediana ($p=0,20$).

Tabela 5.7- Óbito em indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe, segundo faixa etária.

Idade	Óbito						Total	
	Sim		Não		Não informado		n	%
	n	%	n	%	n	%		
30 ---50	1	7,1	4	7,8	0	0,0	5	7,1
50 ---60	5	35,7	11	21,6	2	40,0	18	25,7
60 ---70	3	21,5	14	27,5	0	0,0	17	24,3
70 ---80	5	35,7	17	33,3	0	0,0	22	31,5
80 ou mais	0	0,0	5	9,8	0	0,0	5	7,1
Não informada	0	0,0	0	0,0	3	60,0	3	4,3
Total	14	100,0	51	100,0	5	100,0	70	100,0

Probabilidade do teste G, $p=0,36$.

Tabela 5.8- Óbitos por carcinoma nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe segundo idade mediana.

Óbito	Idade*				Total	
	<65 anos		≥65 anos		n	%
	n	%	n	%		
Sim	8	23,5	6	18,2	14	20,9
Não	24	70,6	27	81,8	51	76,1
Não informado	2	5,9	0	0,0	2	3,0
Total	34	100,0	33	100,0	67	100,0

*3 indivíduos não tiveram a idade e óbito informados. Probabilidade do teste G, $p=0,20$.

Ao analisarem-se os fatores de risco relacionados com o desenvolvimento do câncer bucal e de laringe, verificou-se que 3,1% ($n=2$) da amostra tinha o hábito somente do etilismo, 26,2% ($n=17$) somente tabagismo, 46,1% ($n=30$) fazia o uso do álcool e fumo e 24,6% ($n=16$) não fazia uso de álcool e tabaco (Tabela 5.9).

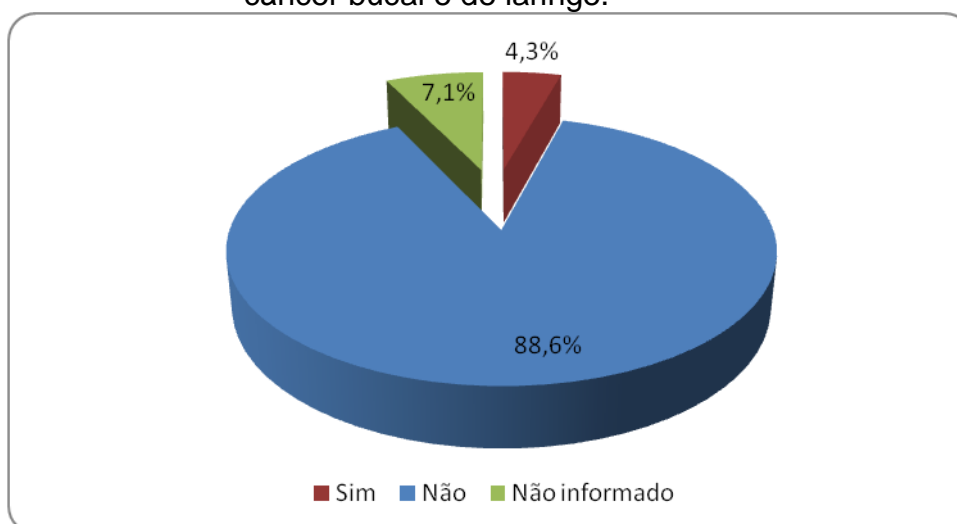
O uso de prótese estava presente em apenas 4,3% ($n=3$) da amostra (Gráfico 5.2).

Tabela 5.9- Tabagismo e etilismo nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.

Variável	Bucal		Laringe		Total	
	n	%	n	%	n	%
Somente etilismo	1	2,8	1	3,4	2	3,1
Somente tabagismo	6	16,7	11	37,9	17	26,2
Etilismo e tabagismo	17	47,2	13	44,9	30	46,1
Não consumia ambos	12	33,3	4	13,8	16	24,6
Total	36	100,0	29	100,0	65	100,0

#Cinco unidades amostrais não tinham a informação sobre etilismo e tabagismo. Probabilidade do teste G, $p=0,14$.

Gráfico 5.2 - Uso de prótese nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.



O teste exato de Fisher foi utilizado para medir a associação do óbito com o uso do fumo e álcool (Tabela 5.10). Dos indivíduos que faziam uso somente do tabaco 35,8% (n=5) foram a óbito, dos que consumiam somente álcool 7,1% (n=1) faleceram. Sete (50%) indivíduos que consumiam álcool e tabaco foram a óbito, contudo não foi encontrada associação estatisticamente ($p=0,23$)

Tabela 5.10- Associação de tabagismo e etilismo nos óbitos de indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.

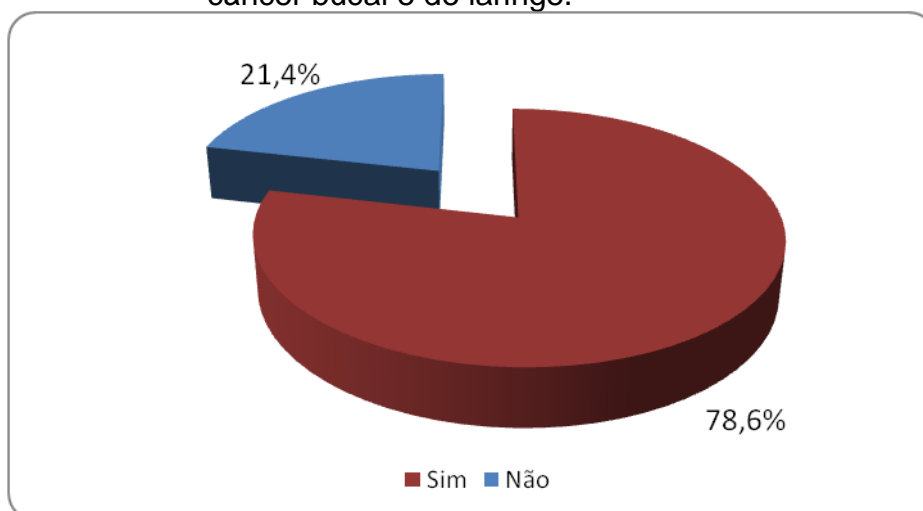
Variáveis	Óbito [#]				Total	
	Sim		Não		n	%
	n	%	n	%		
Somente etilismo	1	7,1	1	2,0	2	3,1
Somente tabagismo	5	35,8	12	23,5	17	26,2
Etilismo e tabagismo	7	50,0	23	45,1	30	46,1
Não consumia ambos	1	7,1	15	29,4	16	24,6
Total	14	100,0	51	100,0	65	100,0

[#]Cinco unidades amostrais não tinham a informação sobre óbito. Probabilidade do teste G, $p=0,23$.

Detecção de HPV e EBV

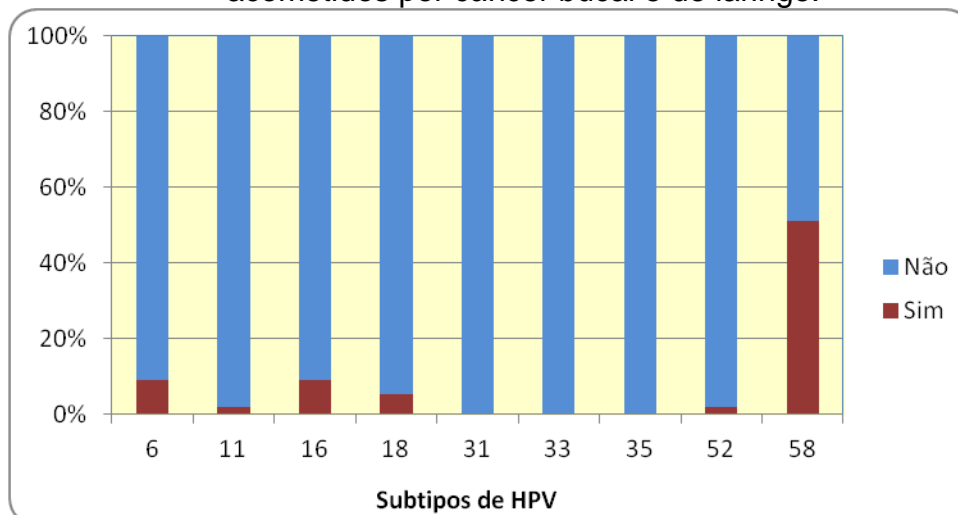
No presente estudo 78,6% (n=55) dos participantes estavam infectados pelo HPV (Gráfico 5.3).

Gráfico 5.3- Infecção por HPV nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.



As amostras infectadas pelo HPV foram submetidas à tipagem para os subtipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58. Um total de 9,1% (n=5) foram positivos para HPV 6, 1,8% (n=1) para HPV 11, 9,1% (n=5) para HPV 16, 5,5% (n=3) para HPV 18, 1,8% para HPV 52 (n=1) e 50,9% (n=28) para HPV 58. Nenhuma amostra foi positiva para HPV 31, 33 e 35 (Gráfico 5.4). Nove amostras foram positivas para mais de um subtipo de HPV. Quatro foram positivas para HPV 06 e 58, uma para HPV 11 e 58, duas para HPV 16 e 58, uma para HPV 52 e 58 e uma para HPV 18 e 58. Vinte e uma amostras não foram positivas para nenhum dos 09 subtipos testados.

Gráfico 5.4- Presença de subtipos de HPV nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.



A mortalidade por câncer segundo a localização da lesão e tipo de HPV presente está representada na Tabela 5.11. A maioria dos óbitos está relacionada com a presença do HPV 58 (21,4%, n=6), sendo 17,6% (n=3) em câncer bucal e 27,3% em laringe (n=3). O HPV 6 também foi observado em 25% de câncer bucal (n=1).

Tabela 5.11- Mortalidade por câncer segundo localização da lesão e tipo de HPV presente.

Tipo de Vírus	Óbito	Localização				Total	
		Bucal		Laringe		n	%
		n	%	n	%		
HPV 6	Sim	1	25,0	0	0,0	1	20,0
	Não	3	75,0	1	100,0	4	80,0
HPV 11	Sim	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Não	1	100,0	0	0,0	1	100,0
HPV 16	Sim	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Não	5	100,0	0	0,0	5	100,0
HPV 18	Sim	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Não	0	0,0	3	100,0	3	100,0
HPV 31	Sim	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Não	0	0,0	0	0,0	0	0,0
HPV 33	Sim	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Não	0	0,0	0	0,0	0	0,0
HPV 35	Sim	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Não	0	0,0	0	0,0	0	0,0
HPV 52	Sim	0	0,0	0	0,0	0	0,0
	Não	0	0,0	1	100,0	1	100,0
HPV 58	Sim	3	17,6	3	27,3	6	21,4
	Não	14	82,4	8	72,7	22	78,6

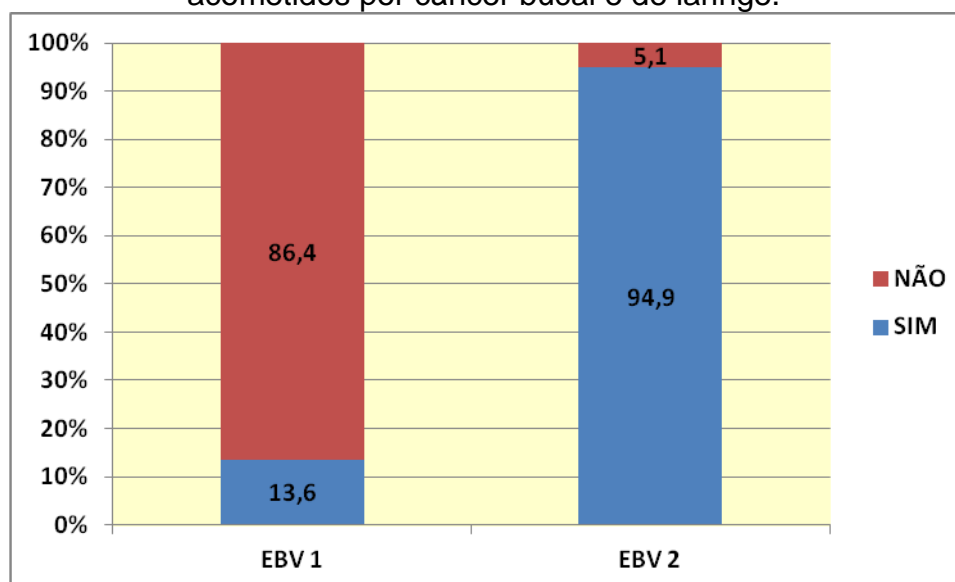
Quando verificada a prevalência do EBV constatou-se que 84,3% (n=59) da amostra estava infectada por este vírus (Tabela 5.12).

Tabela 5.12- Infecção por EBV nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.

Infecção por EBV	n	%
Sim	59	84,3
Não	11	15,7
Total	70	100,0

Quando realizada a PCR para tipagem dos subtipos de EBV a presença de EBV 2 foi predominante, sendo encontrado em 94,9% (n=56/59 amostras testadas) das amostras positivas. O EBV 1 foi encontrado em somente 13,6% (n=8/59 amostras testadas). Quatro amostras estavam infectadas para os dois tipos de EBV (Gráfico 5.5).

Gráfico 5.5- Caracterização dos subtipos de EBV nos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe.



A mortalidade por câncer segundo localização da lesão e tipo de EBV (Tabela 5.13) demonstra que a mortalidade pelo EBV 1 foi observada em 25% da amostra (n=2) e pelo EBV 2 em 21,4% (n=12). A mortalidade pelo EBV 1 ocorreu somente no câncer bucal, já pelo EBV 2 foi identificada para câncer bucal e de laringe (n=6 para as duas associações).

Tabela 5.13- Mortalidade por câncer segundo localização da lesão e tipo de EBV presente.

Tipo de Vírus	Óbito	Localização				Total	
		Bucal		Laringe		n	%
		n	%	n	%		
EBV 1	Sim	2	50,0	0	0,0	2	25,0
	Não	2	50,0	4	100,0	6	75,0
EBV 2	Sim	6	17,6	6	27,3	12	21,4
	Não	28	82,4	16	72,7	44	78,6

Ao verificar-se a associação entre a infecção do HPV com a localização da lesão (Tabela 5.14) observou-se que dos 55 casos que estavam infectados pelo HPV 61,9% (n=34) localizavam-se na boca e 38,1% (21) na laringe. O teste exato de Fisher apresentou p igual a 0,38, não sendo estatisticamente significativa a associação da infecção do HPV com a localização da lesão.

A associação do estadio da lesão e a infecção pelo HPV foram realizadas através do teste G (p = 0,14), sem significância estatística.

Para verificar a associação entre a infecção pelo HPV e a mortalidade foi utilizado o teste exato de Fisher, sendo encontrado p-valor igual a 0,72, sem significância estatística. Vale ressaltar que até o momento da colheita de dados a maioria dos pacientes permanecia viva.

Tabela 5.14- Associação entre a infecção pelo HPV e localização da lesão, o estadiamento e mortalidade nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.

Variáveis	Infecção por HPV						p*
	Sim		Não		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Localização do tumor							
Boca	34	61,9	7	46,7	41	58,6	0,38 [€]
Laringe	21	38,1	8	53,3	29	41,4	
Estadio							
I	1	3,8	0	0,0	1	2,8	0,14 [¥]
II	3	11,5	1	10,0	4	11,1	
III	2	7,7	4	40,0	6	16,7	
IV	20	77,0	5	50,0	25	69,4	
Mortalidade							
Sim	10	20,0	4	26,7	14	21,5	0,72 [€]
Não	40	80,0	11	73,3	51	78,5	

* Probabilidade do teste estatístico.

[€] Teste exato de Fischer.

[¥] Teste G.

A associação da infecção do HPV com faixa etária, sexo, cor da pele e estado civil está representada na Tabela 5.15.

Em relação à faixa etária pode-se perceber que tanto os indivíduos infectados pelo HPV quanto os não infectados encontram-se distribuídos com maior frequência na faixa etária de 70 a 80 anos (32,7%, n=17), com p valor de 0,93.

Quanto ao sexo também não houve diferença estatisticamente significativa, já que os homens apresentam uma frequência maior que as mulheres nos dois grupos aqui envolvidos, com infecção e sem infecção pelo HPV.

Também não foi observada diferença estatisticamente significativa entre a cor da pele e o estado civil.

Tabela 5.15- Associação entre a infecção do HPV com faixa etária, sexo, cor da pele e estado civil dos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.

Variáveis	Infecção por HPV				Total		p*
	Sim		Não		n	%	
	n	%	n	%			
Faixa etária							
30 ---50	4	7,7	1	6,7	5	7,5	0,93 [‡]
50 ---60	15	28,8	3	20,0	18	26,9	
60 ---70	12	23,1	5	33,3	17	25,4	
70 ---80	17	32,7	5	33,3	22	32,7	
80 ou mais	4	7,7	1	6,7	5	7,5	
Sexo							
Feminino	7	13,5	2	13,3	9	13,4	1,00 [€]
Masculino	45	86,5	13	86,7	58	86,6	
Cor da pele							
Negra	11	24,4	6	40,0	17	28,3	0,44 [‡]
Parda	11	24,4	2	13,3	13	21,7	
Branca	23	51,2	7	46,7	30	50,0	
Estado civil							
Solteiro	7	13,7	3	20,0	10	15,2	0,71 [‡]
Casado	25	49,1	5	33,3	30	45,4	
Viúvo	4	7,8	2	13,4	6	9,1	
Outros	15	29,4	5	33,3	20	30,3	

* Probabilidade do teste estatístico.

€ Teste exato de Fischer.

‡ Teste G.

Três unidades amostrais não tinham informação sobre idade.

Para verificar a associação entre a infecção do HPV com tabagismo, etilismo e uso de prótese dentária nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe foi utilizado o teste exato de Fisher (Tabela 5.16).

O tabagismo fator de risco ao desenvolvimento do câncer bucal foi relatado com alta frequência, tanto nos pacientes infectados por HPV (68,0%, n=34) quanto nos não infectados (86,7%, n=13).

O etilismo, outro fator de risco, foi observado com frequências semelhantes, tanto quando observada entre o grupo infectado pelo HPV e o grupo não infectado, como também na frequência nos grupos isolados, com um p-valor de 1,00.

O uso de prótese foi pouco encontrado na amostra. Apenas 03 indivíduos relataram seu uso, não possibilitando assim a associação do uso da prótese com a presença de HPV e conseqüentemente o câncer bucal.

Tabela 5.16- Associação entre a infecção do HPV com tabagismo, etilismo e uso de prótese dentária nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.

Variáveis	Infecção por HPV						p*
	Sim		Não		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Tabagismo							
Sim	34	68,0	13	86,7	47	72,3	0,20 [€]
Não	16	32,0	2	13,3	18	27,7	
Etilismo							
Sim	25	50,0	7	46,7	32	49,2	1,00 [€]
Não	25	50,0	8	53,3	33	50,8	
Uso de prótese dentária							
Sim	3	6,0	0	0,0	3	4,6	0,58 [€]
Não	47	94,0	15	100,0	62	95,4	
Total	50	100,0	15	100,0	65	100,0	-----

* Probabilidade do teste estatístico.

[€] Teste exato de Fischer.

A associação da ocorrência de óbito e tabagismo e óbito e etilismo com a infecção por HPV foram realizadas através do teste exato de Fisher e estão expressas nas Tabelas 5.17 e 5.18.

Entre os pacientes infectados por HPV que faziam uso do tabaco 80,0% (n=8) e 65% (n=26) foram a óbito ou não respectivamente. O p-valor foi de 0,31. Quando observado o uso do álcool 60,0% (n=6) e 47,5% (n=19) faleceram ou permaneciam vivos até o registro dos dados (p=0,72).

Tabela 5.17- Associação da ocorrência de óbito e de tabagismo com a infecção por HPV.

HPV	Tabagismo	Óbito				Total		p [€]
		Sim		Não				
		n	%	n	%	n	%	
HPV+	Sim	8	80,0	26	65,0	34	68,0	0,31
	Não	2	20,0	14	35,0	16	32,0	
HPV-	Sim	4	100,0	9	81,8	13	86,7	1,00
	Não	0	0,0	2	18,2	2	13,3	
	Total	14	100,0	51	100,0	65	100,0	-----

*Cinco unidades amostrais não tinham informação sobre óbito.

[€] Valor da probabilidade do teste exato de Fisher.

HPV+ = presença de HPV.

HPV- = ausência de HPV.

Tabela 5.18- Associação da ocorrência de óbito e de etilismo com a infecção por HPV.

HPV	Etilismo	Óbito				Total		p [€]
		Sim		Não		n	%	
		n	%	n	%			
HPV+	Sim	6	60,0	19	47,5	25	50,0	0,72
	Não	4	40,0	21	52,5	25	50,0	
HPV-	Sim	2	50,0	5	45,5	7	46,7	1,00
	Não	2	50,0	6	54,5	8	53,3	
Total		14	100,0	51	100,0	65	100,0	-----

*Cinco unidades amostrais não tinham informação sobre óbito.

€Valor da probabilidade do teste exato de Fisher.

HPV+ = presença de HPV.

HPV- = ausência de HPV.

A associação entre a infecção pelo EBV com a localização da lesão, o estadiamento e mortalidade nos indivíduos acometidos por câncer de boca e laringe está representada na Tabela 5.19. Os resultados encontrados não demonstraram diferença estatisticamente significativa para nenhuma dessas associações. p valores de 1,00, 0,47, 0,44 para localização da lesão, estadiamento e mortalidade foram observados respectivamente.

Tabela 5.19- Associação entre a infecção do EBV com a localização da lesão, o estadiamento e mortalidade nos indivíduos acometidos por câncer de boca.

Variáveis	Infecção por EBV				Total		p*
	Sim		Não		n	%	
	n	%	n	%			
Localização							
Boca	35	59,3	6	54,5	41	58,6	1,00 [€]
Laringe	24	40,7	5	45,5	29	41,4	
Estadio							
I	1	3,4	0	0,0	1	2,8	0,47 [¥]
II	4	13,8	0	0,0	4	11,1	
III	5	17,2	1	14,3	6	16,7	
IV	19	65,6	6	85,7	25	69,4	
Mortalidade							
Sim	13	23,6	1	10,0	14	21,5	0,44 [€]
Não	42	76,4	9	90,0	51	78,5	

* Probabilidade do teste estatístico.

€ Teste exato de Fischer.

¥ Teste G.

A associação entre a infecção pelo EBV com a faixa etária, sexo, cor da pele e estado civil dos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe está expressa na Tabela 5.20.

A infecção por EBV foi encontrada em maior prevalência na faixa etária de 70 a 80 anos (34,0%, n=19), seguida da faixa de 50 a 60 anos (28,6%, n=16). Entre os não infectados pelo EBV a maioria encontrava-se na faixa etária de 60 a 70 anos (45,4%, n=5). O p-valor foi de 0,39. Em relação ao sexo, o masculino predominou tanto nos indivíduos infectados quanto nos não infectados, com p-valor de 0,34.

Quando observada a associação entre cor da pele e infecção pelo EBV, 42,0% (n=21) dos indivíduos brancos, 32,0% (n=16) dos negros e 26,0% (n=13) dos pardos apresentaram infecção pelo EBV. Entre os não infectados pelo EBV 90,0% (n=9) eram brancos e 10,0% (1) negros. Houve associação estatística entre as duas características com um p-valor <0,01. Entre os indivíduos infectados pelo EBV a maioria era casada (49,1%, n=27) e entre os não infectados a maioria declarou ter outro tipo de estado civil. O p encontrado foi de 0,56, sem significância estatística.

Tabela 5.20- Associação entre a infecção do EBV com faixa etária, sexo, cor da pele e estado civil dos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.

Variáveis	Infecção por EBV				Total		p*
	Sim		Não		n	%	
	n	%	n	%			
Faixa etária							
30 ---50	5	8,9	0	0,0	5	7,5	0,39 [‡]
50 ---60	16	28,6	2	18,2	18	26,9	
60 ---70	12	21,4	5	45,4	17	25,4	
70 ---80	19	34,0	3	27,3	22	32,7	
80 ou mais	4	7,1	1	9,1	5	7,5	
Sexo							
Feminino	9	16,1	0	0,0	9	13,4	0,34 [€]
Masculino	47	83,9	11	100,0	58	86,6	
Cor da pele							
Negra	16	32,0	1	10,0	17	28,3	<0,01 [‡]
Parda	13	26,0	0	0,0	13	21,7	
Branca	21	42,0	9	90,0	30	50,0	
Estado civil							
Solteiro	8	14,5	2	18,2	10	15,2	0,56 [‡]
Casado	27	49,1	3	27,3	30	45,4	
Viúvo	5	9,1	1	9,1	6	9,1	
Outros	15	27,3	5	45,4	20	30,3	

* Probabilidade do teste estatístico.

€ Teste exato de Fischer. ‡ Teste G.

Quando se verificou a associação entre a infecção do EBV com o tabagismo, etilismo e prótese (Tabela 5.21), a maioria dos pacientes fazia uso do tabaco tanto no grupo dos infectados (69,1%, n=38) quanto nos não infectados (90,0%, n=9). Em relação ao álcool 54,5% (n=30) dos infectados por EBV não bebia e 70,0% (n=7) dos não infectados ingeria álcool. Os três indivíduos (5,5%) que referiram uso de prótese apresentaram-se infectados pelo EBV. Contudo os valores encontrados no teste exato de Fisher, $p = 0,26$, $p = 0,18$ e $p = 1,00$ não foram estatisticamente significantes para o tabagismo, etilismo e uso de prótese respectivamente.

Tabela 5.21- Associação entre a infecção do EBV com tabagismo, etilismo e uso de prótese dentária nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.

Variáveis	Infecção por EBV				Total		p*
	Sim		Não		n	%	
	n	%	n	%			
Tabagismo							
Sim	38	69,1	9	90,0	47	72,3	0,26 [€]
Não	17	30,9	1	10,0	18	27,7	
Etilismo							
Sim	25	45,5	7	70,0	32	49,2	0,18 [€]
Não	30	54,5	3	30,0	33	50,8	
Uso de prótese dentária							
Sim	3	5,5	0	0,0	3	4,6	1,00 [€]
Não	52	94,5	10	100,0	62	95,4	
Total	55	100,0	10	100,0	65	100,0	-----

* Probabilidade do teste estatístico.

€ Teste exato de Fischer.

A associação da ocorrência de óbito e uso do tabaco com a infecção por EBV está representada na Tabela 5.22. Observa-se que 84,6% (n=11) dos pacientes tabagistas infectados por EBV foram a óbito. Entretanto entre os sobreviventes foram encontrados 64,3% (n=27) tabagistas infectados por EBV, com p-valor de 0,19.

Entre os pacientes não infectados por EBV um fumante (100,0%) veio a óbito e 88,9% (n=8) permaneceram vivos até o registro dos dados (p=1,00).

Tabela 5.22- Associação da ocorrência de óbito e de tabagismo com a infecção por EBV nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.

EBV	Tabagismo	Óbito				Total		p [€]
		Sim		Não		n	%	
		n	%	n	%			
EBV+	Sim	11	84,6	27	64,3	38	69,1	0,19
	Não	2	15,4	15	35,7	17	30,9	
EBV-	Sim	1	100,0	8	88,9	9	90,0	1,00
	Não	0	0,0	1	11,1	1	10,0	
Total		14	100,0	51	100,0	65	100,0	-----

*Cinco unidades amostrais não tinham informação sobre óbito.

€Valor da probabilidade do teste exato de Fisher.

EBV+ = presença de EBV.

EBV- = ausência de EBV.

Não foi encontrada associação entre o óbito e etilismo com a infecção pelo EBV ($p=0,54$ e $p=1,00$ para indivíduos infectados e não infectados por EBV respectivamente). Sete indivíduos (53,8%) infectados por EBV e 18 (42,9%) dos não infectados foram a óbito (Tabela 5.23).

Tabela 5.23- Associação da ocorrência de óbito e de etilismo com a infecção por EBV nos indivíduos acometidos por câncer de boca e de laringe.

EBV	Etilismo	Óbito				Total		p [€]
		Sim		Não		n	%	
		n	%	n	%			
EBV+	Sim	7	53,8	18	42,9	25	45,5	0,54
	Não	6	46,2	24	57,1	30	54,5	
EBV-	Sim	1	100,0	6	66,7	7	70,0	1,00
	Não	0	0,0	3	33,3	3	30,0	
Total		14	100,0	51	100,0	65	100,0	-----

*Cinco unidades amostrais não tinham informação sobre óbito.

€Valor da probabilidade do teste exato de Fisher.

EBV+ = presença de EBV.

EBV- = ausência de EBV.

A relação entre a localização e a prevalência de co-infecção por HPV e EBV (Tabela 5.24) demonstra que a laringe é o local que mais apresenta co-infecção pelos vírus estudados com 37,5% ($n=18$). Em relação às estruturas orais a língua é a área mais afetada pela co-infecção (16,7%, $n=8$) seguido pelo palato (16,4%, $n=8$). A laringe também é predominante nas infecções pelo HPV e EBV isoladamente (42,8%, $n=3$; 54,5%, $n=6$ respectivamente). Língua, palato e retromolar apresentaram um caso de infecção somente pelo HPV (14,3%). Na infecção

somente para EBV foi observada frequência de 27,3% (n=3) e 9,1% (n=1) para o palato e orofaringe.

Tabela 5.24- Prevalência da co-infecção por HPV e EBV segundo localização da lesão de câncer bucal e de laringe.

Local	Infecção HPV e EBV		Somente HPV		Somente EBV		Negativo para ambos		Total	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Assoalho	3	6,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0	3	4,3
Orofaringe	1	2,1	0	0,0	1	9,1	0	0,0	2	2,9
Laringe	18	37,5	3	42,8	6	54,5	2	50,0	29	41,5
Língua	7	14,6	1	14,3	1	9,1	0	0,0	9	12,9
Maxila	1	2,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,4
Hipofaringe	0	0,0	1	14,3	0	0,0	0	0,0	1	1,4
Palato	7	14,3	0	0,0	3	27,3	0	0,0	10	14,3
Palato mole	0	0,0	1	14,3	0	0,0	2	50,0	3	4,3
Lábio	1	2,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,4
Lábio Superior	1	2,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,4
Lábio Inferior	1	2,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,4
Boca	5	10,5	0	0,0	0	0,0	0	0,0	5	7,2
Língua e orofaringe	1	2,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,4
Oro e hipofaringe	1	2,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,4
Palato e seio	1	2,1	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	1,4
Retromolar	0	0,0	1	14,3	0	0,0	0	0,0	1	1,4
Total	48	100,0	7	100,0	11	100,0	4	100,0	70	100,0

5.2. INDIVÍDUOS APARENTEMENTE SADIOS EXAMINADOS A PARTIR DA RASPAGEM DA MUCOSA ORAL

5.2.1. Caracterização da amostra

A Tabela 5.25 apresenta a caracterização dos indivíduos desse grupo segundo a faixa etária, sexo e cor da pele.

Em relação a faixa etária 80,8% (n=134) tinham de 18 a 49 anos de idade, 12,0% (n=20) de 50 a 59 anos e 7,2% (n=12) de 60 a 79 anos. A idade média foi de 35,9 e a mediana 33 anos.

Quanto ao gênero 62,0% (n=103) da amostra pertencia ao sexo feminino e 38% (n=63) ao masculino. Quando observada a cor da pele 75,3% (n=125) eram pardos, 13,3% (n=22) negros e 11,4% (n=19) brancos.

Tabela 5.25- Caracterização dos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral segundo faixa etária, sexo e raça.

Caracterização	n	f%
Faixa etária		
18 ---50	134	80,8
50 ---60	20	12,0
60 ---70	10	6,0
70 ---80	2	1,2
Sexo		
Feminino	103	62,0
Masculino	63	38,0
Cor da pele		
Negra	22	13,3
Parda	125	75,3
Branca	19	11,4
Total	166	100,0

O uso do tabaco e do álcool entre o grupo de raspagem da mucosa oral está representado na Tabela 5.26. Do total da amostra 155 indivíduos (93,4%) declararam não fazer uso do tabaco e 127 (76,5%) não ingerir álcool.

Tabela 5.26- Tabagismo e etilismo nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.

Variável	n	%
Tabagismo		
Sim	11	6,6
Não	155	93,4
Etilismo		
Sim	39	23,5
Não	127	76,5
Total	166	100,0

A Tabela 5.27 demonstra a infecção por HPV a partir da raspagem da mucosa oral. A prevalência de indivíduos infectados pelo HPV foi de 24,1% (n=40).

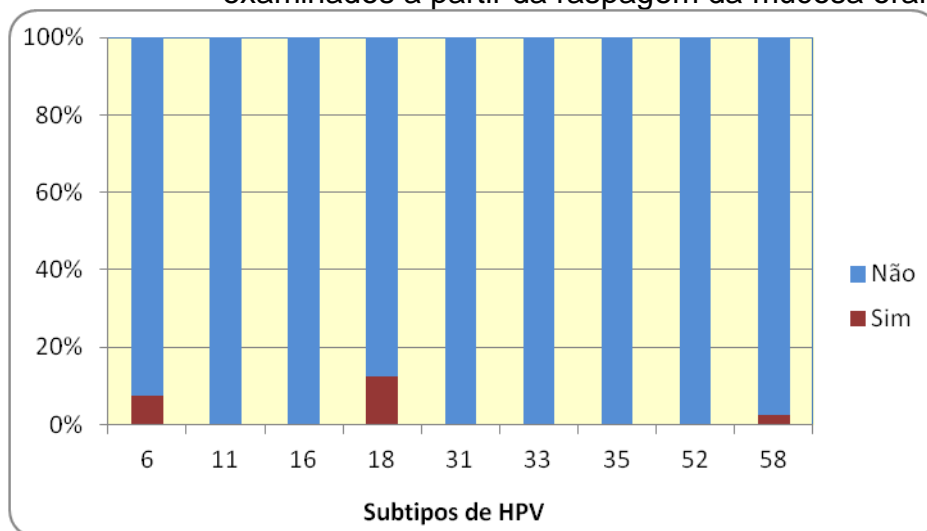
Tabela 5.27- Infecção por HPV nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.

Infecção por HPV	n	%
Sim	40	24,1
Não	126	75,9
Total	166	100,0

As amostras dos indivíduos infectados pelo HPV foram submetidas a PCR para tipagem dos subtipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 58 em tempo real e observou-se a presença do HPV 6 em 7,5% (n=03); HPV 18 em 12,5% (n=05); HPV 58 em 2,5% (n=01).

Os HPVs 11, 16, 31, 33, 35 e 52 não foram encontrados em nenhuma das amostras investigadas (Gráfico 5.6).

Gráfico 5.6- Presença de subtipos de HPV nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.



A infecção por EBV nos indivíduos examinados através de raspado bucal foi de 45,8% (n=76) (Gráfico 5.7). Ao ser realizada PCR para tipagem nas 76 amostras infectadas 21,0% foram positivas para EBV 1 (n=16) e 82,9% para EBV 2 (n=63). Observou-se que três amostras apresentaram EBV 1 e 2 (Gráfico 5.8).

Gráfico 5.7- Infecção por EBV nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.

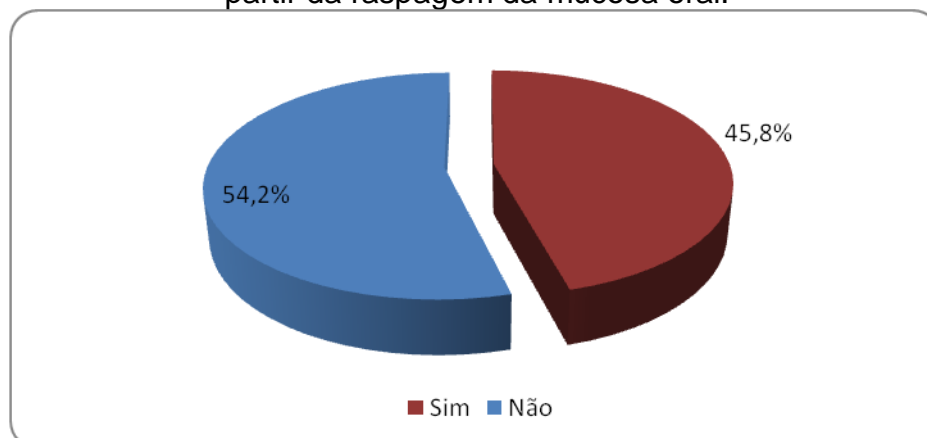
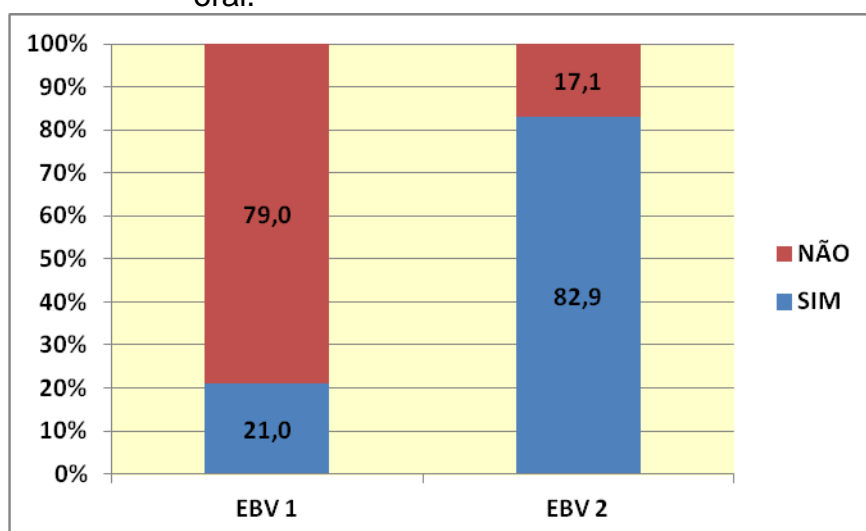


Gráfico 5.8- Presença de subtipos de EBV nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.



Não foi observada associação entre a infecção pelo HPV e a idade ($p=0,24$) e sexo ($p=0,57$) (Tabela 5.28).

A associação entre infecção por HPV e a cor da pele foi estatisticamente significativa ($p=0,03$). Houve uma maior proporção de negros no grupo de não infectados (16,7%, $n=21$) que em relação ao infectados por HPV (2,5%, $n=1$).

Tabela 5.28- Associação entre a infecção do HPV com faixa etária, sexo e cor da pele dos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.

Variáveis	Infecção por HPV				Total		p*
	Sim		Não				
	n	%	n	%	n	%	
Faixa etária							
18 ---50	28	70,0	106	84,1	134	80,7	0,24 [‡]
50 ---60	6	15,0	14	11,1	20	12,0	
60 ---70	5	12,5	5	4,0	10	6,0	
70 ---80	1	2,5	1	0,8	2	1,2	
Sexo							
Feminino	23	57,5	80	63,5	103	62,0	0,57 [€]
Masculino	17	42,5	46	36,5	63	38,0	
Cor da pele							
Negra	1	2,5	21	16,7	22	13,3	0,03 [‡]
Parda	34	85,0	91	72,2	125	75,3	
Branca	5	12,5	14	11,1	19	11,4	
Total	40	100,0	126	100,0	166	100,0	-----

* Probabilidade do teste estatístico.

€ Teste exato de Fischer.

‡ Teste G.

O consumo do álcool e do tabaco não apresentou associação com a infecção pelo HPV nos indivíduos que realizaram o raspado bucal (Tabela 5.29).

Tabela 5.29- Associação entre a infecção do HPV com tabagismo e etilismo nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.

Variáveis	Infecção por HPV						p*
	Sim		Não		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Tabagismo							
Sim	3	7,5	8	6,3	11	6,6	0,99 [€]
Não	37	92,5	118	93,7	155	93,4	
Etilismo							
Sim	11	27,5	28	22,2	39	23,5	0,52 [€]
Não	29	72,5	98	77,8	127	76,5	
Total	40	100,0	126	100,0	166	100,0	-----

* Probabilidade do teste estatístico.

[€] Teste exato de Fischer.

Não foi observada associação entre faixa etária, sexo e cor da pele com a presença do EBV nos participantes da pesquisa examinados a partir da raspagem da mucosa oral (Tabela 5.30).

Tabela 5.30- Associação entre a infecção do EBV com faixa etária, sexo e cor da pele dos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.

Variáveis	Infecção por EBV						p*
	Sim		Não		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Faixa etária							
18 ---50	63	82,9	71	78,9	134	80,7	0,10 [¥]
50 ---60	5	6,6	15	16,7	20	12,0	
60 ---70	7	9,2	3	3,3	10	6,0	
70 ---80	1	1,3	1	1,1	2	1,2	
Sexo							
Feminino	46	60,5	57	63,3	103	62,0	0,74 [€]
Masculino	30	39,5	33	36,7	63	38,0	
Cor da pele							
Negra	10	13,2	12	13,3	22	13,3	0,70 [¥]
Parda	59	77,6	66	73,3	125	75,3	
Branca	7	9,2	12	13,3	19	11,4	
Total	76	100,0	90	100,0	166	100,0	-----

* Probabilidade do teste estatístico.

[€] Teste exato de Fischer.

[¥] Teste G.

O uso do fumo foi encontrado em apenas 10,5% (n=8) dos indivíduos infectados pelo EBV e em 3,3% (n=3) entre os não infectados. O álcool era consumido por 25,0% (n=19) entre os infectados e 22,2% (n=20) entre os não

infectados. Os p-valores encontrados para o tabagismo ($p=0,11$) e etilismo ($p=0,71$) não foram estatisticamente significantes (Tabela 5.31).

Tabela 5.31- Associação entre a infecção do EBV com tabagismo e etilismo nos indivíduos examinados a partir da raspagem da mucosa oral.

Variáveis	Infecção por EBV						p*
	Sim		Não		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Tabagismo							
Sim	8	10,5	3	3,3	11	6,6	0,11 [€]
Não	68	89,5	87	96,7	155	93,4	
Etilismo							
Sim	19	25,0	20	22,2	39	23,5	0,71 [€]
Não	57	75,0	70	77,8	127	76,5	
Total	76	100,0	90	100,0	166	100,0	-----

* Probabilidade do teste estatístico.

€ Teste exato de Fischer.

5.3. RESULTADOS COMPARATIVOS ENTRE OS DOIS GRUPOS ESTUDADOS

A comparação entre a caracterização dos dois grupos estudados em relação a faixa etária, sexo, cor da pele, uso do tabaco e álcool foi estatisticamente significativa com p -valor $< 0,01$ (Tabelas 5.32 e 5.33).

Tabela 5.32- Caracterização dos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe e dos indivíduos do grupo de raspado bucal segundo faixa etária, sexo e cor da pele.

Caracterização	Câncer		Raspado		p*
	n	%	n	%	
Faixa etária					
18 ---50	5	7,1	134	80,8	<0,01
50 ---60	18	25,7	20	12,0	
60 ---70	17	24,3	10	6,0	
70 ---80	22	31,5	2	1,2	
80 ou mais	5	7,1	0	0,0	
Não informada	3	4,3	0	0,0	
Sexo					
Feminino	9	12,9	103	62,0	<0,01
Masculino	58	82,8	63	38,0	
Não informado	3	4,3	0	0,0	
Cor da pele					
Negro	17	24,3	22	13,3	<0,01
Pardo	13	18,6	125	75,3	
Branco	30	42,8	19	11,4	
Não informada	10	14,3	0	0,0	
Total	70	100,0	166	100,0	-----

*Teste G.

Tabela 5.33- Caracterização dos indivíduos acometidos por câncer bucal e de laringe e grupo de raspado bucal segundo tabagismo e etilismo.

Caracterização	Câncer		Raspado		p*
	n	%	n	%	
Tabagismo					
Sim	47	72,3	11	6,6	<0,01
Não	18	27,7	155	93,4	
Etilismo					
Sim	32	49,2	39	23,5	<0,01
Não	33	50,8	127	76,5	
Total	70	100,0	166	100,0	-----

*Teste do Qui-quadrado.

A prevalência da infecção por HPV e EBV e suas co-infecções demonstra que o HPV foi encontrado em 78,6% (n=55) nos indivíduos portadores de câncer bucal e de laringe, enquanto que no grupo de raspado bucal a prevalência foi de 24,1% (n=40) com p-valor <0,01.

Em relação ao EBV a frequência no grupo de câncer foi de 84,3% (n=59) e no raspado bucal foi de 45,8% (n=76). p-valor <0,01.

Já a prevalência da infecção conjunta de HPV e EBV foi encontrada em 68,6% (n=48) no grupo de câncer e em 15,1% (n=25) no raspado bucal. Teste qui-quadrado apresentou p-valor<0,01, demonstrando associação (resultado) estatisticamente significativa entre os grupos de câncer bucal e de laringe e o grupo de raspado bucal em todas as relações expressas na Tabela 5.34.

Tabela 5.34- Prevalência da infecção por HPV e EBV e suas co-infecções nos grupos amostrais estudados.

Infecção	Grupos amostrais						p*
	Câncer		Raspado		Total		
	n	%	n	%	n	%	
Infecção por HPV							
Positivo	55	78,6	40	24,1	95	40,3	<0,01
Negativa	15	21,4	126	75,9	141	59,7	
Infecção por EBV							
Positivo	59	84,3	76	45,8	135	57,2	<0,01
Negativa	11	15,7	90	54,2	101	42,8	
Infecção por HPV e EBV							
Positivo	48	68,6	25	15,1	73	30,9	<0,01
Somente para HPV	7	10,0	15	9,0	22	9,3	
Somente para EBV	11	15,7	51	30,7	62	26,3	
Negativo para ambos	4	5,7	75	45,2	79	33,5	
Total	70	100,0	166	100,0	236	100,0	-----

* Probabilidade do teste do qui-quadrado.

A razão de chances de prevalência da ocorrência de câncer bucal e de laringe segundo a caracterização de subtipos de HPV e EBV (Tabela 5.35) foi estatisticamente significativa para HPV 58 ($p < 0,01$) e EBV 2 ($p < 0,01$). O HPV 6 foi detectado em 5 casos de câncer com razão de chances de prevalência (ORp) 4,2. O HPV 58 foi positivo para 29 amostras entre os dois grupos estudados, sendo que 28 eram do grupo de câncer bucal e de laringe com ORp=110,0.

O EBV 2 foi encontrado em 56 (56/59) casos de câncer com ORp de 6,6.

Tabela 5.35- Ocorrência de câncer segundo a caracterização de subtipos de HPV e EBV.

Variável / Categorias	n	Câncer	%	ORp (IC 95%)	p-valor*
HPV 6					
Positivo	8	5	62,5	4,2	0,05
Negativo	228	65	28,5	(0,97 a 18,00)	
HPV 11					
Positivo	1	1	100,0	176443	0,94
Negativo	235	69	29,4	(0,00 a infinito)	
HPV 16					
Positivo	5	5	100,0	187301	0,87
Negativo	231	65	28,1	(0,00 a infinito)	
HPV 18					
Positivo	8	3	37,5	1,4	0,62
Negativo	228	67	29,4	(0,34 a 6,31)	
HPV 31					
Positivo	0	0	0,0	2,4	1,00
Negativo	236	70	100,0	(0,00 a infinito)	
HPV 33					
Positivo	0	0	0,0	2,4	1,00
Negativo	236	70	100,0	(0,00 a infinito)	
HPV 35					
Positivo	0	0	0,0	2,4	1,00
Negativo	236	70	100,0	(0,00 a infinito)	
HPV 52					
Positivo	1	1	100,0	176443	0,94
Negativo	235	69	29,4	(0,00 a infinito)	
HPV 58					
Positivo	29	28	96,6	110,0	<0,01*
Negativo	207	42	20,3	(14,5 a 831,9)	
EBV 1					
Positivo	24	8	33,3	1,1	0,90
Negativo	211	62	24,9	(0,45 a 2,46)	
EBV 2					
Positivo	119	56	47,1	6,6	<0,01*
Negativo	117	14	12,0	(3,37 a 12,71)	

ORp = Razão de chances de prevalência, IC 95% = Intervalo de confiança de 95%. *Associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$).

A prevalência de infecção por HPV e EBV e a razão de prevalências na ocorrência de câncer (Tabela 5.36) foi verificada através do teste qui-quadrado, havendo associação estatística entre os grupos amostrais e a infecção tanto por

HPV quanto por EBV, incluindo também a associação com a co-infecção do HPV e EBV, com p-valor <0,0001 para infecção por HPV e 0,0004 para EBV, resultados estatisticamente significantes.

A razão de chances para ocorrência de câncer nos indivíduos infectados pelo HPV é de 8,86 e nos indivíduos infectados pelo EBV é de 4,08.

A infecção pelo HPV tem maior razão de chances para o desenvolvimento do câncer que a infecção pelo EBV.

Tabela 5.36- Prevalência de infecção por HPV e EBV e razão de chances na ocorrência do câncer.

Infecção	Câncer				odds ratio (IC 95%)	p*
	Sim		Não			
	n	%	n	%		
Infecção por HPV						
Positivo	55	78,6	40	24,1	8,86 (4,42 a 17,76)	<0,000 1
Negativa	15	21,4	126	75,9		
Infecção por EBV						
Positivo	59	84,3	76	45,8	4,08	0,0004
Negativa	11	15,7	90	54,2	(1,88 a 8,88)	
Total	70	100,0	166	100,0	-----	-----

odds ratio = razão de chances.

IC 95% = intervalo de confiança de 95%.

* Probabilidade do teste do qui-quadrado.

A prevalência da co-infecção por HPV e EBV e o valor probabilístico estimado para a ocorrência de câncer, expressa na Tabela 5.37, demonstra que o indivíduo portador de câncer infectado pelos dois vírus estudados tem 65,72% de probabilidade para desenvolver câncer, enquanto o indivíduo infectado somente pelo HPV tem 31,94% de probabilidade e o infectado somente por EBV 17,79%.

Tabela 5.37- Prevalência da co-infecção por HPV e EBV e valor probabilístico estimado para a ocorrência de câncer.

Infecção	Câncer				Pi (%)
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Infecção por HPV e EBV					
Ambos	48	68,6	25	15,1	65,72
Somente para HPV	7	10,0	15	9,0	31,94
Somente para EBV	11	15,7	51	30,7	17,79
Negativo para ambos	4	5,7	75	45,2	5,03
Total	70	100,0	166	100,0	-----

Pi = Estimação do valor probabilístico exato para ocorrência de câncer.

6. DISCUSSÃO

O câncer bucal é considerado um problema de saúde pública no Brasil. Devido a dificuldade de acesso da população ao Sistema de Saúde vigente no país a maioria dos casos de câncer bucal são diagnosticados em estágios avançados. Isso resulta em tratamento tardio e mais complexo, com pouco impacto em evitar mortes ou sequelas funcionais ou estéticas naqueles que têm maior sobrevida (ANGELO et al., 2010; DIAS et al., 2006).

Hábitos como o tabagismo e o etilismo por muitos anos foram considerados como os principais fatores etiológicos do câncer bucal. Com o desenvolvimento de novos métodos de diagnóstico, em especial da Biologia Molecular, alguns agentes virais têm sido considerados como agentes causais do câncer (NEVILLE et al., 2009; CERRI; BORDINI, 2003).

De fato, tanto o HPV quanto o EBV hoje estão comprovadamente relacionados com vários tipos de tumores e cânceres. Muitos estudos comprovam a associação do HPV com o câncer cervical. Vários outros foram publicados, implicando a relação entre a presença de HPV ou EBV no câncer oral. No Brasil e principalmente na região Norte esses estudos são escassos.

Assim, este estudo teve a proposição de verificar a prevalência do HPV e do EBV no câncer bucal e na mucosa oral normal, descrevendo também os tipos virais mais frequentes na população estudada.

O perfil da amostra de pacientes acometidos por câncer bucal e de laringe foi de pacientes em sua maioria com mais de 50 anos de idade, com média de 64,8 anos, brancos, do sexo masculino, corroborando com dados encontrados na literatura que afirmam serem os homens, brancos, acima de 50 anos os mais afetados pelo câncer bucal (CARLI et al., 2009; NEVILLE et al., 2009; JITOMIRSKI, 2008; PEREZ et al., 2007; DEDIVITIS, 2004; CERRI; BORDINI, 2003).

Santos et al. (2009) em estudo epidemiológico de câncer bucal em Alagoas encontraram predomínio de pardos (69,19%), seguido de brancos (27,02%).

Em relação à localização das lesões de câncer bucal a maior prevalência foi no palato, seguido da língua e assoalho bucal.

A localização do câncer na cavidade bucal difere em alguns estudos (Quadro 6.1).

Quadro 6.1- Localização de câncer bucal em diferentes estudos.

ESTUDO	LOCALIZAÇÃO		
	PALATO	LINGUA	ASSOALHO
Dedivitis et al., 2004 (Santos/SP)	-	+++	+
Neville et al., 2009 (Estados Unidos)	-	+++	+
Melo et al., 2010 (Juiz de Fora/MG)	-	+++	+
Kaminagakura et al., 2012 (Hospital A.C. Camargo/SP)	-	+++	+
Perez et al., 2007 (Hospital Heliópolis/SP)	-	+++	+
Brener et al., 2006 (revisão literatura)	-	+++	+
Teixeira et al., 2009 (Fortaleza/CE)	-	+	+++
Araújo et al., 2013 (Belém/PA)	+++	++	+

+++ - Maior prevalência

++ - Prevalência intermediária

+ - Menor prevalência

- sem citação

Em síntese a língua foi a área mais afetada no câncer bucal na maioria dos estudos realizados, divergindo da frequência encontrada neste estudo onde o palato foi mais frequente. A maior frequência de câncer no palato pode estar relacionada ao hábito do tabagismo e pela prática do fumo invertido por alguns indivíduos participantes do estudo. Neville et al. (2009) relataram que o risco do tabagismo aumenta em culturas isoladas da Índia e América do Sul, onde a prática do fumo invertido é popular, principalmente entre as mulheres. Nesses casos a ponta acesa do cigarro ou charuto feito à mão é mantida no interior da cavidade oral, elevando o risco do câncer e atingindo o palato duro em 50% das lesões.

O estadiamento das neoplasias é fator importante para a indicação do tratamento a ser realizado. A maioria das lesões incluídas no presente estudo estava no estadio IV, seguidas do estadio I, III e II respectivamente, em ordem de frequência. A maior prevalência do estadio IV coincide com os achados em diversos estudos (KAMINAGAKURA et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2009; JOTZ et al., 2007; PEREZ et al., 2007). Brener et al. (2006) e Dedivitis et al. (2004) encontraram maior prevalência do estadio II.

A predominância de lesões no estadio IV confirma a dificuldade do diagnóstico precoce do câncer bucal. Essa dificuldade reflete o pouco acesso da população brasileira aos serviços de saúde e a falta de esclarecimento sobre a

doença, já que exames periódicos poderiam diagnosticar o câncer bucal na sua fase inicial. Assim, a maioria dos pacientes procura atendimento somente quando os sintomas dolorosos começam a surgir ou quando a lesão dificulta a mastigação.

A adoção do tratamento mais adequado depende do estadiamento, do tipo de tumor, do envolvimento ósseo, da saúde geral do paciente e da capacitação do especialista. A cirurgia permanece como primeira opção de tratamento do câncer bucal, devendo a radioterapia ser indicada quando o tumor não pode ser removido cirurgicamente com margem de segurança ou pelo estado avançado da lesão (BRENER et al., 2006).

Os indivíduos inseridos neste estudo receberam predominantemente tratamento cirúrgico, quer de maneira isolada (28,8%) quer em associação com radioterapia, quimioterapia ou suporte clínico (24,2%), seguido de tratamento radioterápico e quimioterápico conjunto (17,1%).

Tratamento cirúrgico (53%) e tratamento cirúrgico e radioterapia adjuvante (47%) também foram os tratamentos mais observados por Dedivitis et al. (2004).

Angelo et al. (2010) observaram que o tratamento cirúrgico e radioterápico associado (36%) e a radioterapia isolada foram os tratamentos predominantes em João Pessoa-Paraíba.

Teixeira et al. (2009) e Kaminagakura et al. (2012) verificaram que o tratamento cirúrgico complementado por radioterapia foi o tratamento de escolha, seguido do tratamento cirúrgico apenas. Contudo Santos et al. (2009) observaram que os tratamentos mais realizados em Alagoas foram a radioterapia (47,68%) e a cirurgia (24,74%).

No Brasil o câncer bucal implica em uma alta morbimortalidade que se destaca mundialmente. Trata-se do câncer mais comum da região da cabeça e pescoço, excluindo-se o câncer de pele. O Brasil apresenta a mais alta incidência de cânceres da boca e faringe da América Latina, com grandes variações regionais. As regiões sul e sudeste apresentam taxa superior a 12 por 100 mil entre os homens e as regiões Centro-Oeste, Norte e Nordeste uma taxa mais baixa que varia de 9 a 3 por 100 mil (INCA, 2011; MACIEL et al., 2012).

A mortalidade observada na amostra incluída no presente estudo foi de 20% (14 pacientes). Apesar do tabagismo e etilismo não terem tido uma associação estatística pelo Teste exato de Fisher, com o óbito, tais fatores foram marcantes nos

pacientes que tiveram evolução fatal, já que 85,7% e 57,1% faziam uso do tabaco e do álcool respectivamente.

Jotz et al. (2007) encontraram 24% de óbito em pesquisa realizada no Hospital Independência da ULBRA em Porto Alegre-Rio Grande do Sul, percentual próximo aos encontrados neste estudo. A amostra era constituída de homens em sua maioria e com estadiamento IV.

Dedivitis et al. (2004) relataram que 30,3% dos pacientes acometidos de câncer de boca e 68,0% com câncer de orofaringe faleceram durante o acompanhamento mínimo de 26 meses. Perez et al. (2007) observaram mortalidade de 73,3%, percentual bastante elevado quando comparado a este estudo.

O hábito do tabagismo e o consumo excessivo de álcool isoladamente ou em sinergismo são considerados fatores de risco para o câncer bucal e/ou de laringe (ANG; STURGIS, 2012; SCULLY, 2011; PETTI; SCULLY, 2010).

O tabagismo foi observado em 26,2%, o etilismo em 3,1% e o uso simultâneo em 46,1% dos portadores de câncer do presente estudo. Não consumiam tabaco e álcool 24,6% dos indivíduos. Frequências consideradas semelhantes a outros estudos, nos quais o percentual de tabagistas e/ou etilistas é em geral acima de 70% (DEDIVITIS et al., 2004; JOTZ et al., 2007; KAMINAGAKURA et al., 2012)

O risco do câncer bucal e de laringe pelo uso combinado do álcool e do fumo é de mais de 80% quando comparado aos indivíduos sem esses hábitos (SCULLY, 2011).

O uso de próteses bucais mal adaptadas, com câmaras de sucção ou bordas cortantes, pode funcionar como fator irritante, sendo também considerado como fator de risco ao câncer bucal.

O uso de prótese estava presente em apenas 03 (4,3%) indivíduos acometidos pelo câncer bucal e de laringe. Poucos estudos incluem a prótese como fator de risco. Dedivitis et al. (2004) constataram o uso de prótese em 21% dos pacientes acometidos por câncer de boca e em 48% dos pacientes com câncer de orofaringe. Apesar do percentual elevado do uso de prótese dentária, Dedivitis et al. (2004) não encontraram associação das mesmas a um risco maior de câncer das vias aerodigestivas superiores, mas histórias de úlceras orais secundárias a má adaptação já foram associadas ao câncer bucal e de faringe. Assim o cirurgião

dentista deve evitar qualquer fator que possa funcionar com agente irritante da cavidade bucal.

O HPV é reconhecidamente um vírus oncogênico, especialmente associado aos cânceres de colo uterino e anorretal. A possível relação do HPV com câncer bucal tem sido investigada recentemente (KAMINAGAKURA et al., 2012; NEVILLE et al., 2009; TERMINE et al., 2008; SYRJÄNEN, 2003). Esta questão tem importância epidemiológica, pois é estimado que o número de infecções causadas pelo HPV atinge um milhão de novos casos por ano (INCA, 2011).

A relação do HPV com o carcinoma de células escamosas orais (CCEO) é variável. De fato, vários estudos tem investigado o papel do HPV no CCEO, mas os resultados são altamente controversos (SOARES et al., 2007). Chama atenção, portanto que a prevalência de HPV encontrada neste estudo tenha sido elevada, de 78,6% na amostra testada.

Esse achado foi bem acima dos percentuais de HPV em tumores de boca encontrados em outros estudos, nos quais a presença viral foi detectada entre 20 e 36% (SNIJDERS et al., 1996; KREIMER et al., 2005; GIOVANNELLI et al., 2006; SOARES et al., 2007; SIMONATO et al., 2008; GONZÁLEZ-LOSA et al., 2008; GHEIT et al., 2009; KAMINAGAKURA et al., 2012), ou até 50% (ANAYA-SAAVEDRA et al., 2008; CORRENTI et al., 2004; SZARKA et al., 2009). Entretanto a prevalência de HPV deste estudo foi próxima a encontrada por Maxwell et al., 2010 (82,0%); Zhang et al. em 2004 (74%) e abaixo das encontradas por Kansky et al. em 2003 (95,0%); Koyama et al. e Sugiyama et al. em 2007 (100% em ambas).

O câncer de colo do útero é o mais incidente na região norte após os tumores de pele não melanoma (24/100 mil). O HPV apresenta uma alta taxa de infecção nessa região. Freitas (2012) verificou uma prevalência de 97,3% (36/37) para portadoras de câncer de colo de útero no estado do Pará.

Pinto et al. (2011) em amostra constituída de 444 mulheres residentes no estado do Pará encontraram infecção genital pelo HPV em 14,6% (65/444) das mesmas. Já Amaral (2012) detectou 22,8% (16/70) de pacientes portadoras de lúpus eritematoso sistêmico infectadas pelo HPV em um hospital de referência na cidade de Belém.

Após a tipagem das amostras infectadas detectadas neste estudo, o HPV 58 foi o mais prevalente, encontrado em 50,9% (n=28), seguido dos HPVs 6 e 16 com 9,1% (n=5) para ambos, e HPV 18 com 5,5% (n=3). HPV 11 e HPV 52 estavam

presentes em 1,8% (n=1) das amostras positivas. HPV 31, 33 e 35 não foram encontrados nas amostras examinadas. Assim, excetuando-se o HPV 6, chama atenção a predominância de HPVs considerados de alto risco.

A maioria dos estudos (Tabela 6.1) realizados em câncer bucal encontrou com maior frequência o HPV 16 e HPV 18 (KAMINAGAKURA et al., 2012; MAXWELL et al., 2010).

O HPV 58 foi encontrado em 10,8% no câncer de colo de útero por Freitas (2012) e em 37,5% em pacientes portadoras de lúpus eritematoso sistêmico por Amaral (2012), sugerindo que este tipo de HPV pode ser mais frequente na população do estado do Pará e que a presença do HPV na cavidade oral pode estar relacionada com a prática de sexo oral.

Tabela 6.1- Frequência de HPV e subtipos em câncer bucal.

ESTUDO	LOCAL DO ESTUDO	% DE TUMORES DE BOCA COM HPV	TIPOS DE HPV (%)					
			6	16	18	35	58	NÃO TIPADOS
Kaminagakura et al., 2012	São Paulo	19,2 (n=22/114)	-	66,3	0,8	-	-	
Maxwell et al., 2010	Michigan	82,3 (n=102/124)	-	95,0	2,0	3,0	-	
Gheit et al., 2009	Índia	27,5 (n=11/40)	-	27,5	-	-	-	
Soares et al., 2007	Brasil	24,0 (n=18/75)	-	22,2	99,4	-	-	
Araújo et al., 2013	Belém/PA	78,6 (n=55/70)	9,1	9,1	5,5	-	50,9	

O EBV também é um vírus oncogênico que tem sido implicado no desenvolvimento de uma variedade de cânceres (THOMPSON; KURZROCK, 2004). A prevalência do EBV, a semelhança do HPV, tem uma grande variação nos estudos já realizados, revelando desde a ausência do EBV até altas frequências.

A presença do EBV foi detectada em 84,3% dos carcinomas selecionados para este estudo.

Prevalências inferiores a este estudo foram encontradas por Kobayashi et al. em 1999 (15,2%); Sand et al. em 2002 (37,9%); Jalouli et al. em 2010 (37% em usuários de tabaco e 22% em não usuários de tabaco); Jalouli et al. em 2012 (55%), todos realizados em CCEO.

Zheng et al. (2010) em estudo realizado no Japão detectaram a presença do EBV em 84,8%, 91,6% e 75,3% em cânceres localizados na língua, faringe e

laringe respectivamente. Kis et al. (2009) verificaram a presença de EBV em 73,8% na população residente no leste da Hungria.

Higa et al. (2002) compararam a presença do EBV em carcinomas orais em duas populações do Japão, uma em uma ilha subtropical no sul do Japão (Okinawa) e outra no continente japonês (Kitakyushu e Kumamoto). Em Okinawa a frequência foi de 72,2% e em Kitakyushu e Kumamoto apenas 24,4%.

Dois subtipos de EBV são conhecidos: EBV 1 e EBV 2. Ambos diferem em distribuição geográfica. O EBV 1 é observado mais frequentemente na maioria da população. Entretanto EBV 2 é quase tão prevalente quanto com o EBV 1 na Nova Guiné e na África Equatorial (THOMPSON; KURZROCK, 2004; HIGA et al., 2002).

O EBV 1 é predominante em países desenvolvidos. Contudo o tipo 2 foi também encontrado frequentemente na população normal dos Estados Unidos e não somente em áreas endêmicas do linfoma de Burkitt. EBV 1 é encontrado na maioria dos indivíduos saudáveis e dos soros positivos de origem europeia, enquanto indivíduos imunossuprimidos (infectados HIV e transplantados) tem alta taxa de infecção pelo EBV 2 (WU et al., 2007; HIGA et al., 2002).

EBV 1 e EBV 2 foram encontrados em 13,6% e 94,9%, respectivamente, nas amostras envolvidas neste estudo. A prevalência de EBV 2 foi predominantemente inversa a encontrada por Higa et al. em 2002 no Japão onde a predominância do tipo 1 foi encontrada tanto na Ilha de Okinawa quanto no continente japonês (64,1% e 90,0% respectivamente).

Neste estudo não foi constatada associação da infecção pelo HPV com a localização da lesão, mortalidade e estadio da lesão. Kaminagakura et al., (2012) também não encontraram associação entre a positividade do HPV com o estadio e localização da lesão.

O estadio mais frequente da lesão foi o IV tanto na presença ou ausência do HPV. A alta frequência desse estadio demonstra que a maioria dos indivíduos portadores do câncer bucal e de laringe são diagnosticados em fase avançada da doença.

Apesar dos incentivos financeiros oferecidos pelo Ministério da Saúde através da Política de Saúde Bucal (Brasil Sorridente) o estado do Pará não possui uma rede de atendimento de acordo com as diretrizes do Sistema Único de Saúde (SUS), ou seja, com universalidade, integralidade e equidade, onde através de uma rede hierarquizada e por nível de complexidade crescente exista uma prática

adequada para realizar o diagnóstico precoce e tratamento imediato o mais perto possível da residência do usuário, de acordo com a territorialização das ações básicas de saúde.

A Estratégia de Saúde da Família (ESF) que serve como porta de entrada para o atendimento no Sistema Único de Saúde se ressentem de um profissional que tenha habilidades para o diagnóstico precoce do câncer e quando ocorre suspeita de caso e necessidade de referência secundária poucos são os Centros de Especialidades Odontológicas (CEOs) que possuem a estrutura física e profissional com formação adequada (especialista na área). A maioria dos pacientes é diagnosticada em serviços acadêmicos que servem como referência secundária através do sistema de referência e contra referência do SUS pelas Centrais de Regulação Estadual e Municipais ou muitas das vezes nem são referências oficiais, mas realizam a atividade com finalidade didática. Quanto à atenção terciária existe apenas um hospital na capital que serve como referência de alta complexidade para todo estado.

Assim sendo, para evitar os problemas citados acima seria necessário a constante capacitação dos cirurgiões dentistas, a implementação de CEOs de acordo com o protocolo do Ministério da Saúde e da efetivação do Pacto para a Saúde, onde seria definida por região de saúde uma estrutura adequada para a descentralização da atenção em todos os níveis para a prevenção e controle da incidência e da prevalência do câncer bucal no estado.

Em todo o país, o problema também toma características alarmantes com a clara inexistência de políticas públicas de saúde que contemplem a coletividade integralmente e em todas as fases de prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer de boca. A reabilitação, quando necessária após procedimentos cirúrgicos, geralmente é deixada para segundo plano, comprometendo-se assim a qualidade de vida do paciente (DIAS et al., 2006).

A associação para a infecção pelo HPV e o tipo de tratamento recebido só demonstrou associação estatística para o tratamento cirúrgico e infecção pelo HPV. Não ocorreu associação entre a positividade do HPV e a faixa etária, sexo, cor da pele e o estado civil.

Não foi encontrada associação entre a presença de HPV e os fatores de risco tabagismo, etilismo e uso de prótese, assim como a ocorrência de óbito e tabagismo e óbito e etilismo não foi associada com a presença do HPV. Gillison et

al. (2008), Nemes et al. (2006) e Bouda et al. (2000) não verificaram associação entre HPV e o álcool e tabaco em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço.

Em relação ao EBV, assim com o HPV, não foram encontradas associações entre a localização da lesão, o estadiamento, mortalidade, tratamentos realizados, faixa etária, gênero e estado civil com a infecção pelo EBV. O EBV também foi encontrado com maior frequência no estadio IV, confirmando a dificuldade do diagnóstico do câncer bucal e de laringe. Kis et al. (2009) também não encontraram diferenças estatísticas entre a infecção ou não infecção pelo EBV e as variáveis idade, gênero, localização, estadio e gradação histológica dos tumores.

Foi encontrada associação estatística entre a cor da pele e a infecção pelo EBV. Entre os não infectados pelo EBV 90% eram brancos e 10% eram negros.

A associação entre a infecção do EBV e fatores de risco como tabagismo, etilismo e uso de prótese não foi estatisticamente significativa. Esses resultados corroboram os encontrados por Sand et al. (2002) e Kis et al. (2009). Também não ocorreu associação do óbito ao uso do tabaco e do álcool com a presença de EBV, apesar da alta prevalência de pacientes fumantes com infecção por EBV ter ido a óbito (84,6%).

A amostra do grupo de indivíduos com mucosa oral normal foi formada com indivíduos entre 18 e 80 anos, com média de 35,9 anos, com 80,8% até 49 anos, do sexo feminino e cor da pele parda. Este perfil corresponde as características da população paraense e ao de pacientes que procuram atendimento odontológico. Carvalho et al. (2000) relataram que as mulheres procuram mais os serviços de saúde por terem mais preocupação com a saúde e a estética que os homens e estarem vinculadas a tipos de ocupação com horários menos rígidos que os homens na sua maioria. A cor da pele predominante no estado é parda, o que explica a prevalência de 75,3%.

A infecção pelo HPV foi de 24,1%, sendo encontrados os tipos HPV 6 (7,5%), HPV 18 (12,5%) e HPV 58 (2,5%).

Estudos envolvendo a detecção de HPV na mucosa oral normal também divergem bastante na prevalência. Esquenazi et al. (2010) verificaram ausência de HPV nos 100 voluntários universitários pesquisados no Rio de Janeiro. Baixas prevalências foram encontradas por Ammatuna et al. na Itália em 2001 (3,3%) e Migaldi et al. na Itália em 2012 (1,2%). Altas prevalências foram observadas por

Zhang et al. na China em 2004 (55%) e Kristoffersen et al. na Noruega em 2012 (56%).

A prevalência detectada nesse estudo foi similar a encontrada por Llamas-Martinez et al. (2008) em Madri na Espanha, 23,3%. O HPV 16 não foi detectado, corroborando com os dados aqui encontrados.

Kristoffersen et al. (2012) verificaram a presença de HPV 6, HPV 11 e HPV 16. HPV 6 e 11 foram encontrados em duas amostras concomitantemente, HPV 6 em 11 amostras, HPV 11 em 7 amostras e HPV 16 em apenas uma.

Zhang et al. (2004) encontraram HPV 16 e HPV 18 em 13 e 11 amostras de um total de 22 positivas respectivamente. Duas amostras apresentaram ambos os tipos de HPV. Vale ressaltar que os autores pesquisaram apenas os tipos 16 e 18 e concluíram que a infecção por HPV é um evento comum na mucosa oral normal.

A associação entre a infecção pelo HPV com faixa etária e sexo em indivíduos sem lesão na cavidade oral não foi estatisticamente significativa neste estudo, apesar de a maioria da amostra ter menos de 50 anos e ser do gênero feminino. Este achado coincide com o encontrado por Llamas-Martinez et al. (2008).

Foi encontrada associação entre a infecção por HPV e cor da pele ($p=0,03$) a partir do teste G. Os negros apresentaram maior proporção no grupo de não infectados que no grupo de infectados pelo HPV.

Poucos estudos sobre a prevalência de EBV em indivíduos com ausência de lesões na cavidade oral estão disponíveis na literatura. A maioria dos estudos sobre EBV relacionados à cavidade bucal foi executada em indivíduos portadores de câncer bucal, líquen plano, leucoplasia oral e doença periodontal.

Estudos pioneiros investigando a prevalência do EBV na mucosa oral normal mostraram diferentes resultados, que aparentemente dependem do método utilizado ou de como a amostra foi coletada. Esfregaços orais, remoção de células e lavagens da orofaringe mostram alta prevalência de EBV, com 20% a 90% de positividade comparadas a espécimes de biopsias (SAND et al., 2002).

Nesta pesquisa a infecção pelo EBV foi observada em 45,8% da amostra de pacientes com ausência de lesão na cavidade oral, essa prevalência foi superior as encontradas por Sand et al. na Suécia em 2002 (7,3%), Kis et al. na Hungria em 2009 (19,1%), Mao e Smith na Inglaterra em 1993 (25,0%) e Ikuta et al. no Japão em 2000 (38% em crianças), porém inferiores as encontradas por Ikuta et al. em

2000 (90,0% em orofaringe de adultos) e Higgins et al. em Edimburgo em 2007 (75,0%).

Ikuta et al. (2000) encontraram predominância do EBV 1 em 86,0% nos adultos e 94,0% em crianças. Higgins et al. (2007) conseguiram tipar apenas 41% das amostras positivas para EBV. Infecção pelo tipo 1 foi observada 78,0%, pelo tipo 2 em 17% e por ambos os tipos em 5,0%.

Ao investigar-se a infecção dos tipos 1 e 2 neste estudo, foi observada a predominância do tipo 2 em 82,89% das amostras. O EBV 1 foi encontrado em apenas 21,0%. Apenas 3 indivíduos eram portadores de EBV 1 e 2 (3,94%).

Não foram encontradas associações entre a infecção por EBV e faixa etária, sexo e cor da pele, assim como não foi observada associação entre o uso do fumo e álcool e a infecção por EBV.

Sand et al. (2002) não constataram associações entre o uso do fumo, tabaco e o aumento da idade em indivíduos sem lesões na mucosa a semelhança do que foi aqui observado. Higgins et al. (2007) também não observaram associações entre a presença de EBV e fatores de risco em estudante universitários de Edimburgo, porém sugeriram que o EBV pode ser transmitido sexualmente e que os fatores de risco para tipo 1 e 2 podem diferir.

A frequência de EBV, HPV e a co-infecção dos vírus nos grupos estudados está expressa na Tabela 6.2. p-valor <0,01 foi encontrado em todas as três situações.

Os resultados encontrados demonstraram a alta prevalência de HPV e EBV no grupo de câncer bucal quando comparado ao grupo de raspado bucal em indivíduos sem presença de infecção, constatando a associação entre HPV e EBV e a presença de câncer bucal neste estudo.

Tabela 6.2- Frequência de HPV, EBV e co-infecção em câncer bucal e de laringe e raspado bucal.

GRUPO DE ESTUDO	HPV	EBV	CO-INFECÇÃO
CANCER BUCAL	78,6%	84,3%	68,6%
RASPADO	24,1%	45,8%	15,1%

Bouda et al. (2000); Llamas-Martinez et al. (2008) também encontraram presença significativa de HPV de alto risco em carcinomas de células escamosas, sugerindo que o envolvimento precoce de HPV de alto risco na carcinogênese oral.

Contudo Kristoffersen et al. (2012) relataram que o HPV não representava um importante agente causal no desenvolvimento de carcinoma oral.

Kis et al. (2009) apesar de terem encontrado alta prevalência de EBV em carcinomas de células escamosas (73,8%) em comparação aos controles (19,1%) afirmaram que é improvável que o EBV tenha um papel etiológico nessa patologia. Já Sand et al. (2002) declararam que o papel etiológico do EBV precisa ser mais examinado em estudos prospectivos.

Quando comparados os dois grupos estudados em relação a idade, sexo, cor da pele e hábitos do tabagismo e etilismo foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os dois grupos. A cor da pele branca foi predominante no grupo de câncer, demonstrando que indivíduos de pele clara tem maior possibilidade de desenvolverem lesões de câncer bucal, principalmente de lábio pela exposição aos raios solares (NEVILLE, et al., 2009). A maioria dos pacientes do grupo de raspado apresentou cor parda, predominante no estado do Pará.

Indivíduos do grupo de câncer bucal apresentaram idade acima de 50 anos na sua maioria, enquanto no grupo de raspado a idade abaixo de 50 anos predominou. Indivíduos jovens e adultos sem presença de lesão procuram mais frequentemente atendimento odontológico o que se refletiu na amostra do grupo de raspado bucal.

Sexo masculino foi mais prevalente no grupo de câncer, corroborando com a literatura (NEVILLE et al., 2009; DIAS et al., 2006). Mulheres foram predominantes no grupo de raspado.

A prevalência de infecções por HPV e EBV e a razão de chances na ocorrência do câncer demonstrou associação estatística entre os grupos para HPV e EBV através do teste qui-quadrado demonstrando que o paciente infectado pelo HPV e EBV tem 8,86 e 4,08 mais chances de ocorrência do câncer que os não infectados.

A razão de chances de prevalência (ORp) para a ocorrência de câncer bucal e de laringe foi estatisticamente significativa para HPV 58 e EBV 2. A ORp foi acentuada para HPV 58 (110,0 – $p < 0,01$) que para EBV 2 (6,6 – $p < 0,01$), sugerindo forte associação do HPV 58 com o desenvolvimento do câncer no presente estudo. O HPV 6 apresentou ORp de 4,2 ($p = 0,05$), podendo ser considerado também como provável tipo de HPV associado ao desenvolvimento do câncer bucal e de laringe.

Registra-se novamente que o HPV 58 é considerado de alto risco, com localização preferencial em câncer cervical (ROMANOS et al., 2008) e que sua ocorrência na cavidade bucal pode estar relacionada com transmissão através do sexo oral.

Quando verificada a associação da co-infecção por HPV e EBV e o valor probabilístico estimado para a ocorrência do câncer observou-se que a presença da co-infecção tem valor probabilístico de 65,72% para ocorrência de câncer, decrescendo para 31,94% para a presença do HPV e 17,79% para o EBV, sugerindo que a presença do HPV é mais importante para o desenvolvimento do câncer que o EBV.

Os resultados encontrados neste estudo permitem sugerir que os agentes virais (HPV e EBV) são fatores de risco importantes para o desenvolvimento da carcinogênese oral, sendo o HPV mais efetivo que o EBV no desencadeamento da doença. Contudo, como foi citado no desenvolvimento desta pesquisa, diferenças entre os métodos utilizados nos estudos realizados ao longo do tempo deixam dúvidas entre a sociedade científica sobre o papel etiológico dos agentes virais devido a variação de prevalências encontradas nos estudos disponíveis na literatura. Assim se faz necessário a realização de mais estudos para dirimir as dúvidas existentes.

Levando-se em consideração a importância dos agentes virais como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer bucal e a mortalidade e sequelas que a doença pode causar no indivíduo interferindo na sua qualidade de vida e inserção na sociedade, sugere-se em nível de atenção primária melhor acesso do indivíduo aos serviços de saúde que funcionam como porta de entrada do SUS: ESF e Unidades Básicas de Saúde (UBS), com fortalecimento da capacitação aos profissionais que atuam nesses locais para a realização de diagnóstico precoce da doença, que em caso de dúvidas pode ser esclarecido na atenção secundária, representada pelos CEOs, permitindo que o indivíduo tenha um tratamento imediato nos hospitais de referências terciárias.

A realização de exames de biologia molecular para a detecção dos agentes virais, especialmente o HPV, pode ser um excelente método para identificação de indivíduos com maior risco de desenvolvimento da carcinogênese oral, já que a identificação de tipos de alto risco facilitaria o acompanhamento dos indivíduos

infectados e a identificação da lesão poderia ser evidenciada em estado inicial, diminuindo os estádios avançados em que a doença é diagnosticada.

A concepção de que esses exames teriam alto custo não justificam sua não inserção com meio de diagnóstico, já que o custo seria inferior ao despendido com despesas hospitalares advindas da cirurgia, radioterapia e quimioterapia, geralmente necessárias no tratamento do câncer bucal, já que os pacientes são detectados em estadio avançado, onerando o SUS, acrescido dos benefícios que podem trazer ao indivíduo, com um diagnóstico precoce, melhorando assim sua qualidade de vida.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo pode-se concluir:

7.1. A prevalência do HPV e EBV encontrada nas neoplasias orais e de laringe foi alta, com frequência de 78,6% para HPV e de 84,3% para EBV. Em indivíduos sem lesões orais as prevalências encontradas foram de 24,1% e 45,8% para HPV e EBV respectivamente.

7.2. Os tipos mais prevalentes de HPV nas neoplasias foram HPV 58, HPV 6 e HPV 16, com maior frequência do HPV 58. No grupo com ausência de lesões os tipos mais prevalentes HPV 18, HPV 6 e HPV 58, com maior frequência do HPV 18.

7.3. Em relação ao EBV o tipo 2 foi mais prevalente tanto nas lesões neoplásicas quanto nos indivíduos sem lesões.

7.4. A prevalência de câncer bucal foi maior no palato. A presença de co-infecção por HPV e EBV foi encontrada em maior prevalência na laringe. Na cavidade oral a presença de co-infecção foi maior na língua e palato.

7.5. Não houve associação entre a infecção por HPV e EBV entre homens e mulheres nos dois grupos estudados.

7.6. Foi observada associação entre as prevalências de HPV e EBV e suas co-infecções entre os dois grupos estudados, com p-valor <0,01.

7.7. A prevalência de infecção por HPV e EBV e a razão de chances na ocorrência do câncer foi de 8,86 nos indivíduos infectados pelo HPV e de 4,08 nos infectados pelo EBV, demonstrando uma maior razão de chances de desenvolvimento do câncer pela infecção do HPV que pelo EBV.

7.8. O valor probabilístico estimado para prevalência de HPV e EBV e co-infecção e a ocorrência de câncer, evidenciou que o indivíduo portador dos dois vírus tem maior

probabilidade de desenvolver câncer. O indivíduo infectado pelo HPV tem mais probabilidade que o infectado pelo EBV de desenvolver câncer.

7.9. A razão de chances de prevalência para ocorrência do câncer é maior na presença do HPV 58, seguido pelo EBV 2.

REFERÊNCIAS

ALKAN, A.; BULUT, E., GUNHAN, O.; OZDEN, B. Oral verrucous carcinoma: a study of 12 cases. **European Journal of Dentistry**. v. 4, p. 202-207, April, 2010.

ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p.118-129, 2005.

AMARAL, J.L.A. **Estudo da prevalência da infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) em mulheres portadoras de lúpus eritematoso sistêmico (LES) em um hospital de referência de Belém**. 2012. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

AMMATUNA, P.; CAMPISI, G.; GIOVANNELLI, G.; GIAMBELLUCA, D.; ALAIMO, C.; MANCUSO, S.; MARGIOTTA, V. Presence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human papillomavirus in normal oral mucosa of HIV-infected and renal transplant patients. **Oral diseases**, n. 7, p. 34-40. 2001.

ANAYA-SAAVEDRA, G.; RAMÍREZ-AMADOR, V.; IRIGOYEN-CAMACHO, E.; GARCÍA-CUELLAR, C.M.; GUIDO-JIMÉNEZ, M.; MÉNDEZ-MARTÍNEZ, R. GARCÍA-CARRANCÁ, A. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. **Archives of Medical Research**, v. 39, p. 189-197. 2008.

ANG, K.K.; STURGIS, E.M. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. **Semin Radiat Oncol**, v. 22, p. 128-142. 2012.

ANGELO, A.R.; MEDEIROS, A.C.; DE BIASE, R.C.C.G. Qualidade de vida em pacientes com câncer na região de cabeça e pescoço. **Rev Odontol UNESP**, Araraquara, v. 39, n. 1. p. 1-7, jan.-fev., 2010.

BAGAN, J.V.; JIMÉNEZ, Y.; MURILLO, J.; POVEDA, R.; DIAZ, J.M.; GAVALDÁ, C.; MARGAIX, M.; SCULLY, C.; ALBEROLA, T.M.; PUENTE, M.T.; ALONSO, M.P. Epstein-Barr vírus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. **Med. Oral Patol. Cir. Bucal.**, v. 13, n. 2, p. 110-113, Feb. 2008.

BARNES, L.; EVESON, J.; REICHART, P. et al. Oral cavity and oropharynx. In: **World Health Organization Classification of Tumors**. Lyon: IARC Press, 2005, p. 118-121.

BASEMAN, J.G.; KOUTSKY, L.A. The epidemiology of human papillomavirus infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32S, p. 16-24. 2005.

BIAZEVIC, M.G.H.; ANTUNES, J.L.F. Câncer bucal. In: ANTUNES, J.L.F.; PERES, M.A. **Fundamentos de odontologia: Epidemiologia da saúde bucal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2006. p. 180-194.

BOFFETTA, P.; HASHIBE, M. Alcohol and cancer. **Lancet oncol.**, v. 7, n. 2, p.149-156. 2006.

BOLOGNA-MOLINA, R.E.; CASTAÑEDA-CASTANEIRA, R.E.; MOLINA-FRECHERO, N., PÉREZ-RODRIGUEZ, E. Virs del papiloma humano y su asociación com câncer bucal. **Rev. Méd. Inst. Mex. Seguro Soc.**, v. 44. n. 2, p. 147-153, 2006.

BOUDA, M.; GORGOULIS, V.G.; KASTRINAKIS, N.G.; GIANNOUDIS, A.; TSOLI, E.; DANASSI-AFENTAKI, D.; FOUKAS, P.; KYROUDI, A.; LASKARIS, G.; HERRINGTON, S.; KITTAS, C. "High Risk" HPV are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. **Mod Pathol**, v. 13, n. 6, p. 644-653. 2000.

BOULET, G.; HORVATH, C.; BROECK, D.V.; SAHEBALI, S.; BOGERS, J. Human papillomavirus: E6 and E7 oncogenes. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, n. 39, p. 2006-2011, 2007. Disponível em: www.sciencedirect.com. Acesso em: 24 ago. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Regulação, Avaliação e Controle. Coordenação Geral de Sistemas de Informação. **Manual de bases técnicas da Oncologia – SAI/SUS – Sistema de Informações Ambulatoriais**. Brasília, 2010. 100 p. Disponível em www.saude.gov.br/sas. Acesso em 10 out. 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução nº 196**, de 10 de outubro de 1996. 1996. Disponível em: www.saude.gov.br. Acesso em: 10 mar. 2009.

BRENER, S.; JEUNON, F.A.; BARBOSA, A.A.; GRANDINETTI, H.A.M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Rev. bras. cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 1, p. 63-69. 2007.

CARLI, M.L.; SANTOS, S.L.; PEREIRA, A.A.C.; HANEMANN, J.A.C. Características clínicas, epidemiológicas e macroscópicas do câncer bucal diagnosticado na universidade Federal de Alfenas. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 205-211. 2009.

CARVALHO, M.B. História natural do câncer da cavidade oral. In: RAPOPORT, A. **Câncer de Boca**. São Paulo: Pancast Editora, 1997. p.17-29.

CARVALHO, G.; ROSEMBURG, C.P.; BURALLI, K.O. Avaliação de ações e serviços de saúde. **Mundo Saúde**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 72-88, jan./fev. 2000.

CASTRO, T.P.P.G.; BUSSOLOTI FILHO, I. Prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral cavity and oropharynx. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v. 72, n. 2, 2006. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-7299006000200021&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 10 mar. 2008.

CERRI, A.; BORDINI, P.J. Lesões malignas – Diagnóstico, tratamento e controle. In: CARDOSO, R.J.A.; MACHADO, M.E.L. **Odontologia arte e conhecimento**: cirurgia, endodontia, periodontia, estomatologia. São Paulo: Artes Médicas. 2003. v. 1, c. 16, p. 329-336.

CHAUDHARY, A.K.; SINGH, M.; SUNDARAM, S.; MEHROTRA, R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. **Head & Neck Oncology**, v. 1, n. 22, p. 1-12, 2009. Disponível em: www.headandneckoncology.org/content/1/1/22. Acesso em: 25 jun. 2012.

CHAVES, M. M. **Odontologia Social**. 3. ed. Rio de Janeiro: Artes Médicas. 1986.

CHEN, M.R. Epstein-Barr virus, the immune system, and associated diseases. **Frontiers in Microbiology**. v. 2, p. 1-5. 2011. Disponível em: www.frontiersin.org. Acesso em: 05 jul. 2012.

CHEN, S.F.; YU, F.S.; CHANG, Y.C.; FU, E. NIEH, S.; LIN, Y.S. Role of human papillomavirus infection in carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma with evidences of prognostic association. **J Oral Pathol Med**, v. 41, p. 9-15. 2012.

CORRENTI, M.; RIVERA, H.; CAVAZZA, M.E. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. **Oral Diseases**, v. 10, p. 163-166, 2004.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 7ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

DEDIVITIS, R.A.; FRANÇA, C.M.; MAFRA, A.C.B.; GUIMARÃES, F.T.; GUIMARÃES, A.V. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 70, n. 1, p. 35-40, jan./fev. 2004. Disponível em: <http://www.sborl.org.br>. Acesso em: 26 dez. 2012.

DE MARCO, F.; BUCAJ, E.; FOPPOLI, C.; FIORINI, A.; BLARZINO, C.; FILIPI, K.; GIORGI, A.; SCHININÀ, M.E.; DI DOMENICO, F.; COCCIA, R.; BUTTERFIELD, A.; PERLUIGI, M. Oxidative stress in HPV-driven viral carcinogenesis: redox proteomics analysis of HPV-16 dysplastic and neoplastic tissues. **Plos One**, v. 7, n. 3, 2012. Disponível em: www.plosone.org. Acesso em: 10 set 2012.

DIAS, A.A.; SAMPAIO, J.J.C.; REGO, D.M.; LIMA, D.L.F.; DALCICO, R. Políticas públicas e epidemiologia de câncer de boca. In: DIAS, A.A. **Saúde bucal coletiva**. Metodologia de trabalho e práticas. São Paulo: Santos, 2006. p. 297-314.

ESQUENAZI, D.; BUSSOLOTI FILHO, I.; CARVALHO, M.G.C.; BARROS, F.S. A frequência do HPV na mucosa oral normal de indivíduos sadios por meio da PCR. **Braz. J. Otorrinolaryngol.**, v. 76, n. 1, p. 78-84, jan.-fev. 2010.

FOLDVARI, M. HPV infections: Can they be eradicated using nonotechnology? **Nonomedicine**, v. 8, p. 131-135. 2012.

FREITAS, M.C.N. **Estudo do HPV em fragmento uterino de mulheres com câncer do colo do útero**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Núcleo de Medicina Tropical, Universidade Federal do Pará, Belém, 2012.

GAO, J.; PANIZZA, B.; JOHNSON, N.W.; COMAN, S.; CLOUGH, A.R. Basic consideration of research strategies for head and neck cancer. **Front. Med.**, v. 6, n. 4, p. 339-353. 2012.

GERVÁSIO, O.L.A.S.; DUTRA, R.A.; TARTAGLIA, S.M.A.; VASCONCELLOS, W.A.; BARBOSA, A.A.; AGUIAR, M.C.F. Oral squamous cell carcinoma: A retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 57-61. 2001.

GHEIT, T.; VACCARELLA, S.; SCHMITT, M.; PAWLITA, M.; FRANCESCHI, S.; SANKARANARAYANAN, R.; SYLLA, B.S.; TOMMASINO, M.; GANGANE, N. Prevalence of human papillomavirus types in cervical and oral cancers in central India. **Vaccine**, v. 27, p. 636-639. 2009. Disponível em: www.elsevier.com/locate/vaccine. Acesso em: 12 dez 2012.

GILLISON M.L.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W.; SUGAR, E.; XIAO, W.; BEGUM, S.; VISCIDI, R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus 16-negative head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst**, v. 100, p. 407-420. 2008.

GIOVANNELLI, L.; CAMPISI, G.; COLELLA, G.; CAPRA, G.; DI LIBERTO, C.; CALECA, M.P.; MATRANGA, D.; D'ANGELO, M.; LO MUZIO, L.; AMMATUNA, P. Brushing of oral mucosa for diagnosis of HPV infection in patients with potentially malignant and malignant oral lesions. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 10, n. 1, p. 49-55. 2006.

GONÇALVES, M.A.G.; DONADI, E.A. Immune cellular response to HPV: current concepts. **Braz. J. infectar. Dis.**, Salvador, v. 8, n. 1, p. 1-7. 2004.

GONZÁLEZ-LOSA, M.R.; MANZANO-CABRERA, L.; RUEDA-GORDILLO, F.; HERNÁNDEZ-SOLÍS, S.E.; PUERTO-SOLÍS, M. Low prevalence of high risk human papillomavirus in normal mucosa by hybrid capture 2. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 39, p. 32-34. 2008.

GONZÁLEZ, X.; CORRENTI, M.; RIVERA, H.; PERRONE, M. Epstein Barr virus detection and latent membrane protein 1 in oral hairy leukoplakia in HIV + Venezuelan patients. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 15, n. 2, p. e297-302, Mar. 2010. Disponível em: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v15i2/medoralv15i2p297.pdf>. Acesso em: 30 mar. 2012.

GRINSTEIN, S.; PRECIADO, M.V.; GATTUSO, P.; CHABAY, P.A; WARREN, W.H.; MATTEO, E.D.; GOULD, V.E. Demonstration of Epstein-Barr Virus in carcinomas of various sites. **Cancer Research**, n. 62, p. 4876-4878, Sep. 2002.

GROMA, V.; KAZANCEVA, A.; NORA-KRUKLE, Z.; MUROVSKA, M. Oropharyngeal malignant epithelial cell, lymphocyte and macrophage CD44 surface receptors for hyaluronate are expressed in sustained EBV infection: Immunohistochemical data and EBV DNA tissue indices. **Pathology – Research and Practice**, v. 208, p. 518-526. 2012. Disponível em: www.elsevier.com/locate/prp . Acesso em: 12 dez 2012.

HIGA, M.; KINJO, T.; KAMIYAMA, K.; IWAMASA, T.; HAMADA, T.; IYAMA, K. Epstein-Barr vírus (EBV) subtype in EBV related oral squamous cell carcinoma in Okinawa, a subtropical island in southern japan, compared with Kitakyushu and Kumamoto in mainland Japan. **J. Clin. Pathol.**, v. 55, p. 414-423, 2002.

HIGGINS, C.D.; SWERDLOW, A.J. MACSWEEN, K.F.; HARRISON, N.; WILLIAMS, H.; MCAULAY, K.; THOMAS, R.; REID, S. CONACHER, M.; BRITTON, K.; CRAWFORD, D.H. A study of risk factors for acquisition of Epstein-Barr virus and its subtypes. **JID**, v. 195, p. 474-482, 2007.

IKUTA, K.; SATOH, Y.; HOSHIKAWA, Y.; SAIRENJI, T. Detection of Epstein-Barr virus in salivas and throat washings in healthy adults and children. **Microbes and Infection**, v. 2, p. 115-120. 2000

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2012**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011. 118 p.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Coordenação geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Educação. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. Org. Luiz Claudio Santos Thuler. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2012. 129 p. Disponível em: www.inca.gov.br. Acesso em: 31 ago. 2012.

JALOULI, J.; IBRAHIM, S.O.; SAPKOTA, D.; JALOULI, M.M.; VASSTRAND, E.N.; HIRSCH, J.M.; LARSSON, P.A.. Presence of human papilloma virus, herpes simplex virus and Epstein-Barr virus DNA in oral biopsies from Sudanese patients with regard to toombak use. **J Oral Pathol Med**, v. 39, p. 599-604. 2010.

JALOULI, J.; JALOULI, M.M.; SAPKOTA, D.; IBRAHIM, S.O.; LARSSON, P.A.; SAND, L. Human papilloma virus, herpes simplex virus and Epstein Barr virus in oral squamous cell carcinoma from eight different countries. **Anticancer Res**, v. 32, n. 2, p. 571-580, Feb. 2012.

JAVIER, R.T.; BUTEL, J.S. **The history of tumor virology**. *Cancer Res*, v. 68, n. 19. 2008.

JITOMIRSKI, F. Câncer bucal. In: PINTO, V.G. **Saúde bucal coletiva**. 5. ed. São Paulo: Santos. 2008. p. 445-456.

JOTZ, G.P.; DAMAZZINI, R.; DEBONI, M.; DREHER, M.V.; DIAS, J.; DEBONI, A.L.S.; ZETTLER, C.G. Prognóstico em dois anos do câncer de cavidade oral. **Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço**, v. 36, n. 3, p. 146-151, jul./ago./set. 2007.

KAMINAGAKURA, E.; VILLA, L.L.; ANDREOLI, M.A.; SOBRINHO, J.S.; VARTANIAN, J.G.; SOARES, F.A.; NISHIMOTO, I.N.; ROCHA, R.; KOWALSKI, L.P. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Int J Cancer**, v.130, p. 1726-1732. 2012.

KANSKY, A.A.; POLJAK, M.; SEME, K.; KOCJAN, B.J.; GALE, N.; LUZAR, B.; GOLOUH, R. Human papillomavirus DNA in oral squamous cell carcinomas and normal oral mucosa. **Acta Virol**, v. 47, n. 1, p. 11-16. 2003.

KANSKY, A.A.; SEME, K.; MAVER, P.J.; LUZAR, B.; GALE, N.; POLJAK, M. Human papillomaviruses (HPV) in tissue specimens of oral squamous cell papillomas and normal oral mucosa. **Anticancer Research**, v. 26, p. 3197-3202. 2006.

KELLOKOSKI J.; SYRJÄNEN, S.; SYRJÄNEN, K.; YLISKOSKI, M. Oral mucosal changes in women with genital HPV infection. **J Oral Pathol Med**, v. 19, n. 3, p. 142-148, Mar., 1990.

KIS, A.; FEHÉR, E.; GÁLL, T.; TAR, I.; BODA, R.; TÓTH, E.D.; MÉHES, G.; GERGELY, L.; SZARKA, K. Epstein-Barr virus prevalence in oral squamous cell cancer and in potentially malignant oral disorders in an eastern Hungarian population. **Eur J Oral Sci**, v.117, p. 536-540. 2009.

KOBAYASHI, I.; SHIMA, K.; SAITO, I.; KIYOSHIMA, T.; MATSUO, K.; OZEKI, S.; OHISHI, M.; SAKAI, H. Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma. **J Pathol**, v. 189, n. 1, p. 34-39, Sep. 1999.

KOYAMA, K.; UOBE, K.; TANAKA, A. Highly sensitive detection of HPV-DNA in paraffin sections of human oral carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v. 36, n. 1, p. 18-24, Jan. 2007.

KREIMER, A.R.; CLIFFORD, G.M.; BOYLE, P.; FRANCESCHI, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: A systematic review. **Cancer Epidemiol, Biomarkers Prev**, v. 14, p. 467-475. 2005.

KRISTOFFERSEN, A.K.; ENERSEN, M.; KVERNDOKK, E.; SUNDE, P.T.; LANDIN, M.; SOLHEIM, T.; OLSEN, I.; GRINDE, B. Human papillomavirus subtypes in oral lesions compared to healthy oral mucosa. **Journal of Clinical Virology**, v. 53, p. 364-366. 2012.

LEITE, A.C.E.; GUERRA, E.N.S.; MELO, N.S. Fatores de risco relacionados com o desenvolvimento do câncer bucal: revisão. **Rev. Clín. Pesq. Odontol.**, v. 1, n. 3, jan./mar. 2005.

LINDENBLATT, R.C.; MARTINEZ, G.L.; LOURENÇO, S.Q.C.; FARIA, P.A.S. Associação da classificação da OMS e da AHR com fatores clínico-patológicos do câncer de boca. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p. 65-70, jan./jul. 2009.

LLAMAS-MARTÍNEZ, S.; ESPARZA-GÓMEZ, G.; CAMPO-TRAPERO, J.; CANCELA-RODRÍGUEZ, P.; BASCONES-MARTÍNEZ, A.; MORENO-LÓPEZ, L.A.; GARCÍA-NÚÑEZ, J.A.; CERERO-LAPIEDRA, R. Genotypic determination by PCR-RFLP of human papillomavirus in normal oral mucosa, oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma samples in Madrid (Spain). **Anticancer research**, v. 28, p. 3733-3742. 2008.

LO MUZIO, L.; CAMPISI, G.; GIOVANNELLI, L.; AMMATUNA, P.; GRECO, I.; STAIBANO, S.; PANNONE, G.; ROSA, G.D.; LIBERTO, C.D.; D'ANGELO, M. HPV DNA and survivin expression. In epithelial oral carcinogenesis: a relationship? **Oral Oncology**, v. 40, p. 736-741. 2004.

LONGWORT, M.S.; LAIMINS, L.A. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbial. Mol. Biol. Rev.**, v. 68, n.2. Jun. 2004.

LOPES, M.A. Reconhecendo e prevenindo as doenças bucais. In: PEREIRA, A.C. **Odontologia em saúde coletiva**. Planejando ações e promovendo saúde. São Paulo: Artmed, 2003. p. 382-389.

LOURENÇO, S.Q.C.; SCHUELER, A.F.; CAMISASCA, D.R.; LINDENBLATT, R.C.; BERNARDO, V.G. Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. **Rev. bras. cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 53, n.1, p.325-333, 2007.

MACIEL, S.S.S.V.; MACIEL, W.V.; SILVA, R.B.; SOBRAL, L.V.; SOUZA, I.R.S.; SIQUEIRA, M.J. Morbimortalidade por cânceres da boca e faringe em capitais brasileiras. **Revista da AMRIGS**, Porto Alegre, v. 56, n. 1, p. 38-45, jan-mar. 2012.

MARUR, S.; D'DOUZA, G.; WESTRA, W.H.; FORASTIERE, A.A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. **Lancet Oncol**, v. 11, Aug. 2010. Disponível em: www.thelancet.com/oncology. Acesso em: 12 jan. 2013.

MAXWELL, J.H.; KUMAR, B.; FENG, F.Y.; WORDEN, F.P.; LEE, J.S.; EISBRUCH, A.; WOLF, G.T.; PRINCE, M.E.; MOYER, J.S.; TEKNOS, T.N.; CHEPEHA, D.B.; MCHUGH, J.B.; URBA, S.G.; STOERKER, J.; WALLINE, H.M.; KUMIT, D.M.; CORDELL, K.G.; DAVIS, S.J.; WARD, P.D.; BRADFORD, C.R.; CAREY, T.E. Tobacco use in human papillomavirus-positive advanced oropharynx cancer patients related to increased risk of distant metastases and tumor recurrence. **Clin Cancer Res**, v. 16, n. 4, p. 1226-1235, Feb. 2010. Disponível em: www.clinccancerres.aacrjournals.org. Acesso em: 01 jan. 2013.

MELO, L.C.; SILVA, M.C.; BERNARDO, J.M.P.; MARQUES, E.B.; LEITE, I.C.G. Perfil epidemiológico de casos incidentes de câncer de boca e faringe. **Rev. Gaúcha Odontol.**, Porto Alegre, v. 58, n. 3, p. 351-355, jul./set. 2010.

MESQUITA, R.A. **Linfomas de boca: reclassificação e caracterização das células dendríticas**. 2002. 189f. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

MIGALDI, M.; PECORARI, M.; FORBICINI, G.; NANNI, N.; GROTTOLA, A.; GRANDI, T.; DONNE, G.D.; LEOCATA, P. TROVATO, D.; SGAMBATO, A. Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. **J Oral Pathol Med**, v. 41, p. 16-20. 2012.

MOORE, S.R.; JONHSON, N.W.; PIERCE, A.M.; WILSON, D.F. The epidemiology of tongue cancer: A review of global incidence. **Oral Diseases**, v. 6, p. 75-84. 2000.

NEMES, J.A.; DELI, L.; NEMES, Z.; MÁRTON, I.J. Expression of p16^{INK4A}, p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, p. 344-352. 2006.

NEVILLE, B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. Patologia epitelial. In: _____. **Patologia Oral e Maxilofacial**. Rio de Janeiro: Elsevier. 3 ed. 2009. p.363-453.

NGUYEN, N.P.; CHI, A.; NGUYEN, L.M.; LY, B.H.; KARLSSON, U.; VINH-HUNG, V. Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: a new clinic entity. **Q J Med**, doi:10.1093/qjmed/hcp176. 2009.

OLIVEIRA, M.C.; SOARES, RC.; PINTO, L.P.; COSTA, A.L.L. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v. 69, n. 4, p. 553-559, jul./ago. 2003.

OLIVEIRA, M.C.; ANDRADE, M.C.; MENEZES, F.S. Epidemiology of HPV in Head and Neck Cancer. In: BROECK, D.V. (Ed.) **Human papillomavirus and related diseases – From bench to bedside**. 2012. Disponível em: <http://www.intechopen.com.br/books/human-papillomavirus-and-related-diseases-from-bench-to-bedside-a-clinical-perspective/epidemiology-of-hpv-in-head--and-neck-cancer>. Acesso em: 20 nov. 2012.

PEREIRA DE LIMA, M.A.; RABENHRST, S.H.B. Associação do vírus Epstein-Barr (EBV) com tumores sólidos. **Rev. bras. cancerol.**, Rio de Janeiro, v. 52, n. 1, p. 87-96. 2006.

PEREZ, R.S.; FREITAS, S.M.; DADIVITIS, R.A.; RAPOPORT, A.; DENARDIN, O.V.P.; ANDRADE SOBRINHO, J. Estudo epidemiológico do carcinoma espinocelular da boca e orofaringe. **Arq. Int. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 271-277, 2007.

PETTI, S.; SCULLY, C. Determinants of oral cancer at the national level: Just a question of smoking and alcohol drinking prevalence? **Odontology**, n. 98, p. 144-152, 2010.

PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. **Oral Oncology**, v. 45, p. 340-350. 2009.

PINTO, D.S.; FUZII, H.T.; QUARESMA, J.A.S. Prevalência de infecção genital pelo HPV em populações urbana e rural da Amazônia Oriental Brasileira. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 27, n.1, p. 769-778, abr. 2011.

RAAB-TRAUB, N. Novel mechanisms of EBV-induced oncogenesis. **Current Opinion in Virology**, n. 2, p. 1-6. 2012.

REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J.; JORDAN, R.C.K. **Patologia Oral – Correlações clinicopatológicas**. 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ROMANOS, M.T.V.; SANTOS, N.S.O.; FERREIRA, D.C.; MENDES, G.S.; OLIVEIRA, D.P.; MIRANDA, M.F.S. Viroses oncogênicas. In: SANTOS, N.S.O.; ROMANOS, M.T.V.; WIGG, M.D. **Introdução a virologia humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2 ed. 2008. p. 448-478.

RYAN, J.L.; FAN, H.; GLASER, S.L.; SCHICHMAN, S.; RAAB-TRAUB, N.; GULLEY, M.L. Epstein-Barr virus quantitation by real-time PCR targeting multiple gene segments. **J. Molecular Diagnostics**, v. 6, n. 4, p. 378-385, nov. 2004.

SAND, L.P.; JALOULI, J.; LARSSON, P.A.; HIRSCH, J.M. Prevalence of Epstein-barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 93, n. 5, p. 586-592.

SANTOS, L.C.O.; CANGUSSU, M.C.T.; BATISTA, O.M.; SANTOS, J.P. Cancer bucal: amostra populacional do estado de Alagoas em hospital de referência. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 4, p. 524-529, jul./ago. 2009. Disponível em: <http://www.bjorl.org.br>. Acesso em: 26 dez. 2012.

SASAGAWA, T.; TAKAGI, H.; MAKINODA, S. Immune responses against human papillomavirus (HPV) infection and evasion of host defense in cervical cancer. **J Infect Chemother**. 2012. DOI 10.1007/s10156-012-0485-5. Disponível em: pubmed.com.br. Acesso em: 22 nov. 2012.

SCULLY, T.B.; APOLLONI, A.; HURREN, L. MOSS, D.L.; COOPER, D.A. Coinfection with A- and B-type Epstein-barr virus in human immunodeficiency virus-positive subjects. **J Infect Dis**. v. 162, n. 3; p. 643-648. 1990.

SCULLY, C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.16, n. 3, p.e306-e311. 2011 Disponível em: www.medicinaoral.com . Acesso em: 10 dez 2012.

SHEU, B.C.; CHANG, W.C.; LIN, H.H.; CHOW, S.N.; HUANG, S.C. Immune concept of human papillomaviruses and related antigens in local cancer milieu of human cervical neoplasia. **J. Obstet. Gynaecol. Res.**, v. 33, n. 2, p. 103-113. April, 2007.

SILVERMAN JR, S.; KERR, A.R.; ESTEIN, J.B. Oral and pharyngeal cancer control and early detection. **J. Cancer Educ.**, v. 25, n. 3; 279-281. 2010.

- SIMONATO, L.E.; GARCIA, J.F.; SUNDEFELD, M.L.M.M., MATTAR, N.J.; VERONESE, L.A.; MIYAHARA, G.I. Detection of HPV in mouth floor squamous cell carcinoma and its correlation with clinicopathologic variables, risk factors and survival. **J Oral Pathol Med**, v. 37, p. 593-598. 2008.
- SLOTS, J.; SAYGUN, I.; SABETI, M.; KUBAR, A. Epstein-Barr virus in oral diseases. **J. Periodont. Res.**, v. 41, p.235-244. 2006.
- SNIJDERS P.J.; SCHOLEN, A.G.; HART, C.A.; JONES, A.S.; VAUGHAN, E.D.; WOOLGAR, J.A. Prevalence of mucosotropic human papillomaviruses in squamous-cell carcinomas of the head and neck. **Int. J. Cancer**, n. 66, p. 464-469. 1996.
- SNUSTAD, D.P.; SIMMONS, M.J. A base genética do câncer. In: _____. **Fundamentos de genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4 ed. 2008. p. 716-740.
- SOARES, C.P.; MALAVAZI, I.; REIS, R.I.; NEVES, K.A.; ZUANON, J.A.S.; BENATTI NETO, C.; SPOLIDÓRIO, L.C.; OLIVEIRA, M.R.B. Presença do papilomavírus humano em lesões malignas de mucosa oral. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 35, n. 5, p. 439-444, set./out. 2002.
- SOARES, R.C.; CAMPELO, A.J.T.; OLIVEIRA, M.C.; GALVÃO, H.C. Lesões verrucosas orais. **RGO**, Porto Alegre, v. 53, n. 3, p. 201-205, jul./ago./set. 2005.
- SOARES, R.C.; OLIVEIRA, M.C.; SOUZA, L.B.; COSTA, A.L.; MEDEIROS, S.R.B.; PINTO, L.P. Human papillomavirus on oral squamous cells carcinoma in a population of 75 Brazilian patients. **American Journal of Otolaryngology-Head and neck Medicine and Surgery**, v. 28, p. 397-400. 2007.
- STRICKER, T.P.; KUMAR, V. Neoplasia. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R.N. **Robbins Patologia Básica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2008. p. 187-243.
- SUGIYAMA, M.; BHAWAL, U.K.; KAWAMURA, M.; ISHIOKA, Y.; SHIGEISHI, H.; HIGASHIKAWA, K.; KAMATA, N. Human papillomavirus-16 in oral squamous cell carcinoma: clinical correlates and 5-year survival. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 45, n. 2, p. 116-122, Mar. 2007.
- SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus infections and oral tumors. **Med Microbiol Immunol**, v. 192, p. 123-128. 2003.
- SZARKA, K.; TAR, I.; FEHÉR, E.; GÁLL, T.; KIS, A.; TÓTH, E.D.; BODA, R.; MÁRTON, I.; GERGELY, L. Progressive increase of human papillomavirus carriage rates in potentially malignant and malignant oral disorders with increasing malignant potential. **Oral Microbiol Immunol**, v. 24, n. 4, p. 314-318. 2009.
- TEIXEIRA, A.K.M.; ALMEIDA, M.E.L.; HOLANDA, M.E.; SOUSA, F.B.; ALMEIDA, P.C. Carcinoma espinocelular da cavidade bucal: um estudo epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 229-236. 2009.

TERMINE, N.; PANZARELLA, V.; FALASCHINI, S.; RUSSO, A.; MATRANGA, D.; LO MUZIO, L.; CAMPISI. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). **Annals of Oncology**, v. 19, p.1681-1690. 2008.

THOMPSON, M.P.; KURZROCK, R. Epstein-Barr virus and cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, p. 803-821, Feb. 2004.

TOMMASI, A.F. **Diagnóstico em patologia bucal**. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas. 1997. 512 p.

TORRES-PEREIRA, C.C.; ANGELIM-DIAS, A.; MELO, N.S.; LEMOS JR., C.A.; OLVEIRA, E.M.F. Abordagem do câncer de boca: uma estratégia para os níveis primário e secundário de atenção em saúde. **Cad. Saúde Pública**, v. 28, Sup. p.530-539, 2012.

TSAO, S.W.; TSANG, C.M.; PANG, P.S.; ZHANG, G.; CHEN, H.; WAI LO, K. The biology of EBV infection in human epithelial cells. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p. 137-143. 2012. Disponível em: www.elsevier.com/locate/semcancer. Acesso em: 12 dez 2012.

WHITE, R.E.; RAMER, P.C.; NARESH, K.N.; MEIXISPERGER, S.; PINAUD, L.; ROONEY, C.; SAVOLDO, B.; COUTINHO, R.; BÖDÖR, C.; GRIBBEN, J.; IBRAHIM, H.A.; BOWER, M.; NOURSE, J.P.; GANDHI, M.K.; MIDDELDORP, J.; CADER, F.Z.; MURRAY, P.; MÜNZ, C.; ALLDAY, M.J. EBNA3B-deficient EBV promotes B cell lymphomagenesis in humanized mice and found in human tumors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 4, p. 1487-1502, April. 2012. Disponível em: <http://www.jci.org>. Acesso em: 13 dez 2012.

WU, Y.M.; YAN, J.; OJCIUS, D.M.; CHEN, L.L.; GU, Z.Y.; PAN, J.P. Correlation between infections with different genotypes of human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus in subgingival samples and periodontal status of patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 45, n. 11, p. 3665-3670. 2007.

XAVIER, S.D.; BUSSOLOTI FILHO, I.; LANCELLOTTI, C.L.P. Prevalência de achados sugestivos de papilomavírus humano (HPV) em biópsias de carcinoma espinocelular de cavidade oral e orofaringe: estudo preliminar. **Rev. Brás. Otorrinolaringol.**, São Paulo. v. 71, n. 4. p. 510-519. 2005.

XAVIER, S.D.; BUSSOLOTI FILHO, I.; CARVALHO, J.M.; FRAMIL, V.M.S.; CASTRO, T.M.P.G. Frequência de aparecimento de papilomavírus humano (HPV) na mucosa oral de homens com HPV anogenital confirmado por biologia molecular. **Arq. Int. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 36-44, 2007.

ZHANG, Z.Y.; SDEK, P.; CAO, J.; CHEN, W.T. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 33, n. 1, p. 71-74, Jan. 2004.

ZHENG, Y.; XIA, P.; ZHENG, H.C.; TAKAHASHI, H.; MASUDA, S.; TAKANO, Y. The screening of viral risk factors in tongue and pharyngolaryngeal squamous carcinoma. **Anticancer research**, v. 30, p. 1233-1238. 2010.

APÊNDICES

Apêndice A - Ficha clínica para blocos parafinados

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Projeto de Pesquisa de Doutorado

Correlação entre o carcinoma epidermóide e a presença do Papilomavírus Humano (HPV) e do Vírus Epstein-Barr (EBV) no estado do Pará

1. Identificação:

Registro na Patologia HOL _____

Idade: _____ Gênero: _____ Raça: _____

Profissão: _____ Nascimento: _____ Est. Civil: _____

2. Fatores predisponentes:

3. Localização anatômica da lesão: _____

4. Diâmetro da lesão: _____

5. Aspectos da lesão:

6. Estadiamento: _____

7. TNM _____

8. Diagnóstico clínico: _____

9. Diagnóstico histopatológico: _____

10. Data de diagnóstico: _____ Data do início de tratamento: _____

11. Última consulta ou óbito: _____

12. PCR HPV: () Negativa () Positiva Tipos HPV: _____

13. PCR EBV: () Negativa () Positiva Tipos EBV: _____

14. Tratamento: _____

Apêndice B- Ficha clínica para indivíduos sem lesão

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Projeto de Pesquisa de Doutorado

Correlação entre o carcinoma epidermóide e a presença do Papilomavírus Humano (HPV) e do Vírus Epstein-Barr (EBV) no estado do Pará

1. Identificação:

Registro: _____

Idade: _____ Gênero: _____ Raça: _____

Documento de identidade: _____

2. Localização do material coletado:

3. História bucal

Periodontite () Sim () Não

Tártaro () Sim () Não

Cárie dentária () Sim () Não

4. Hábitos

Fumo () Sim () Não

Álcool () Sim () Não

Apêndice C- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para material biológico

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para grupo de material biológico

Eu, Marizeli Viana de Aragão Araújo, aluna de pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical, estou realizando uma pesquisa chamada “Correlação entre o carcinoma epidermóide e a presença do Papilomavírus Humano (HPV) e do vírus Epstein-Barr (EBV) no estado do Pará”, sob orientação da Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros de Sousa.

O objetivo deste trabalho é verificar a associação entre a presença de câncer bucal e os vírus do HPV e EBV.

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa porque sua boca apresentava lesão e você precisou ser operado. No nosso estudo queremos saber se pessoas que tem essas lesões apresentam a presença destes vírus ou não.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária e constará de um exame na lesão que você removeu na cirurgia para confirmar a ausência ou presença do vírus. Sua lesão poderá ser fotografada nesta ocasião, porém sem identificá-lo, por isso você não sofrerá risco físico e psicológico, já que o material foi colhido durante a cirurgia e você não será identificado.

Sua participação não trará qualquer benefício direto, mas proporcionará um melhor conhecimento sobre a relação dos vírus estudados com o câncer de boca.

Você terá a garantia de que as informações obtidas serão analisadas com a preocupação de evitar a identificação de qualquer um dos participantes da pesquisa. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo. Você também tem o direito de ser mantido informado sobre os resultados parciais das pesquisas e caso solicite terá todas as informações disponíveis a qualquer momento.

Não existirão despesas ou compensações pessoais para os participantes da pesquisa em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Eu me comprometo a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados na minha tese para doutorado, artigos científicos em revistas especializadas ou encontros científicos e congressos, sem nunca identificar os participantes.

Abaixo está o consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso não tenha ficado qualquer dúvida.

Consentimento livre e esclarecido

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o trabalho “Correlação entre o carcinoma epidermóide e a presença do Papilomavírus Humano (HPV) e do vírus Epstein-Barr (EBV) no estado do Pará”. Eu discuti com a cirurgiã dentista Marizeli Viana de Aragão Araújo sobre minha decisão de participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos constantes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Belém ____/____/____

Nome: _____

Documento de identidade: _____ Telefone: _____

Endereço: _____

Assinatura do paciente ou responsável legal

Pesquisadora: Marizeli Viana de Aragão Araújo – CRO-PA 1555

Endereços para contato:

Av. Generalíssimo Deodoro, nº 92 – Umarizal, Telefones: 3241-4681, 9985-8812.

Av. Augusto Corrêa nº 1, Faculdade de Odontologia – Guamá, Telefone: 3201-7494.

Apêndice D- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para grupo controle

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos do grupo controle

Eu, Marizeli Viana de Aragão Araújo, aluna de pós-graduação do Núcleo de Medicina Tropical, estou realizando uma pesquisa chamada “Correlação entre o carcinoma epidermóide e a presença do Papilomavírus Humano (HPV) e do vírus Epstein-Barr (EBV) no estado do Pará”, sob orientação da Profa. Dra. Rita Catarina Medeiros de Sousa.

O objetivo deste trabalho é verificar a associação entre a presença de câncer bucal e os vírus do HPV e EBV.

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa porque sua boca não apresenta nenhuma lesão e está normal. No nosso estudo queremos saber se pessoas que tem essas características apresentam a presença destes vírus ou não.

Sua participação nesta pesquisa é voluntária e constará de um exame para confirmar a ausência de lesão na cavidade bucal. Após a confirmação da ausência da lesão será colhido um raspado com escova estéril de um kit especializado para este exame fabricado pela empresa *Libbs*[®]. Este exame não causa nenhuma dor. Sua boca poderá ser fotografada nesta ocasião, porém sem identificá-lo, assim você não sofrerá risco físico ou psicológico ao participar da pesquisa, pois não sofrerá dor, nem será identificado.

Sua participação não trará qualquer benefício direto, mas proporcionará um melhor conhecimento sobre a relação dos vírus estudados com o câncer de boca.

Você terá a garantia de que as informações obtidas serão analisadas com a preocupação de evitar a identificação de qualquer um dos participantes da pesquisa. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo. Você também tem o direito de ser mantido informado sobre os resultados parciais das pesquisas e caso solicite terá todas as informações disponíveis a qualquer momento.

Não existirão despesas ou compensações pessoais para os participantes da pesquisa em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Eu me comprometo a utilizar os dados coletados somente para pesquisa e os resultados serão veiculados na minha tese para doutorado, artigos científicos em revistas especializadas ou encontros científicos e congressos, sem nunca identificar os participantes.

Abaixo está o consentimento livre e esclarecido para ser assinado caso não tenha ficado qualquer dúvida.

Consentimento livre e esclarecido

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o trabalho “Correlação entre o carcinoma epidermóide e a presença do Papilomavírus Humano (HPV) e do vírus Epstein-Barr (EBV) no estado do Pará”. Eu discuti com a cirurgiã dentista Marizeli Viana de Aragão Araújo sobre minha decisão de participar deste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos constantes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos resultados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Belém ____/____/____

Nome: _____

Documento de identidade: _____ Telefone: _____

Endereço: _____

Assinatura do paciente ou responsável legal

Pesquisadora: Marizeli Viana de Aragão Araújo – CRO-PA 1555

Endereços para contato:

Av. Generalíssimo Deodoro, nº 92 – Umarizal, Telefones: 3241-4681, 9985-8812.

Av. Augusto Corrêa nº 1, Faculdade de Odontologia – Guamá, Telefone: 3201-7494.

ANEXOS

Anexo A- Parecer de Ética do CEP do Núcleo de Medicina Tropical



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NÚCLO DE MEDICINA TROPICAL
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** N°008/2009-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** CORRELAÇÃO ENTRE O CÂNCER BUCAL E A PRESENÇA DO PAPILOMAVIRUS HUMANO (HPV) E DO VÍRUS EPSTEIN-BARR (EBV)
3. **Pesquisador Responsável:** Marizeli Viana de Aragão Araújo.
4. **Instituição / Unidade:** NMT/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 09/02/2009.
6. **Data do Parecer:** 11/03/2009.

PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 30 de março de 2009.


Profº Telichi Oikawa
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.