



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

LUISA AGUIRRE BUEXM

**CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE EM
PACIENTES DO INCA: CARACTERÍSTICAS
SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E
MOLECULARES**

Orientadores: Prof^a Dr^a Simone de Queiroz Chaves Lourenço
Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

RIO DE JANEIRO

2018



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

LUIZA AGUIRRE BUEXM

**CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE EM
PACIENTES DO INCA: CARACTERÍSTICAS
SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E
MOLECULARES**

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Oncologia.

Orientadores: Prof^a Dr^a Simone de Queiroz Chaves Lourenço
Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

RIO DE JANEIRO

2018

B928c Buexm, Luisa Aguirre.

Carcinoma de células escamosas de orofaringe em pacientes do INCA: características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares. / Luisa Aguirre Buexm. - Rio de Janeiro: INCA, 2018. xvi.; 144 f.: il.

Tese (Doutorado em Oncologia) - Programa de Pós-Graduação em Oncologia - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018.

Orientadores: Simone de Queiroz Chaves Lourenço.
Luis Felipe Ribeiro Pinto.

1. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. 2. Neoplasias Orofaríngeas. 3. Carcinoma de Células Escamosas. 4. Medicina Bucal. 5. Patologia Bucal. 6. Papillomaviridae. 7. Epigenômica. I. Lourenço, Simone de Queiroz Chaves (Orient.). II. Pinto, Luis Felipe Ribeiro (Orient.). III. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD 616.99448



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

Pós-Graduação em Oncologia

LUISA AGUIRRE BUEXM

**CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE EM
PACIENTES DO INCA: CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS,
CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES.**

Orientadores: Prof^a Dr^a Simone de Queiroz Chaves Lourenço
Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto

Aprovada em ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Doutor Miguel Angelo Martins Moreira - Presidente
Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

Prof. Doutor Fernando Luiz Dias
Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

Prof. Doutor Mario José Romãnach Gonzalez Sobrinho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^a. Doutora Gulnar Azevedo e Silva
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof^a. Doutora Marianna Camargo Cancela - Suplente I
Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

Prof^a. Doutora Leila Maria Cardão Chimelli - Suplente II
Instituto Estadual do Cérebro Paulo Niemeyer

RIO DE JANEIRO

2018

DEDICATÓRIA

À Deus,

Que sempre trouxe e traz a serenidade necessária para minha vida...

À minha Mãe Estela ♥, Minha fortaleza,

Por SEMPRE fazer tudo se tornar possível em minha vida, por estar comigo a cada minuto, mesmo não estando mais aqui, por me ensinar o que é amor incondicional... Tua força e teu amor me dirigiram pela vida e me deram as asas que eu precisava para voar... Obrigada guerreira!!

Ao meu Pai Paulo,

Por estar sempre comigo e fazer parte de todas as minhas conquistas, obrigada por sempre poder contar com seu apoio, independente da situação, pelo amor e carinho que me proporciona.

Ao meu namorado Daniel,

Que acompanhou meus esforços e minhas dificuldades, alegrias e tristezas, sempre me apoiando, me fazendo enxergar o que realmente vale à pena. Obrigada por encontrar em você o amor que preciso para minha vida!

Ao meu irmão Bernardo,

Por me mostrar qual o melhor caminho a seguir (mesmo não sendo fácil...), por ser meu eterno companheiro e amigo. Obrigada por seu apoio em todos os momentos da minha vida!

Aos meu Tio Hugo, minha Tia Lêda e meus primos André e Henrique,

À minha segunda família, por serem meu porto seguro, me apoiando e estimulando a sempre seguir em frente, independente das dificuldades.

Aos meus amigos, minha Tia Anita e à família Aguirre,

Vocês fazem parte da minha educação, do meu caráter, do que sou hoje. Obrigada por permitirem que eu sempre conte com a força e o apoio de vocês!

Símbolo ♥: in memoriam.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia do INCA, pela chance da realização do doutorado. Além dos docentes do Programa que me ensinaram muito sobre os mecanismos da carcinogênese, estimulando a inquietação científica.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Simone de Queiroz Chaves Lourenço que não só me orientou, mas me guiou em direção a pesquisa, mostrando que forma meiga e doce somos capazes de grandes conquistas, sendo sempre justa e humana, refletindo no meu amadurecimento e crescimento. Obrigada por suas sábias soluções em difíceis situações. À minha eterna gratidão.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto pela oportunidade e disponibilidade, total apoio, pelo saber que transmitiu, pelas opiniões e críticas, total colaboração no solucionar de dúvidas e problemas que foram surgindo ao longo da realização deste trabalho e por todas as palavras de incentivo. Obrigada por sempre nos mostrar como devemos nos posicionar como investigadores e por valorizar a real aplicabilidade da pesquisa na assistência ao paciente com câncer.

À Dr^a Sheila Coelho meu respeitoso agradecimento pela dedicação ao trabalho e pela paciência frente as minhas infinitas dúvidas moleculares. Por me receber de braços aberto no laboratório, por desmistificar as técnicas e análises moleculares tão temidas por profissionais clínicos como eu, e por me ensinar de forma simples e dinâmica todas as técnicas e análises moleculares deste trabalho. Você me fez enxergar a biologia como jamais imaginei visualizar.

Aos membros do Laboratório de Biotecnologia Aplicada – Setor de Histologia (LABA), do Laboratório de Pesquisa Clínica em Oncologia (LPCO) e afins da UFF, especialmente Ana Flávia Schueller e Adriana Terezinha Novellino por ir além de um grupo de pesquisa, por sermos praticamente uma família, repleta de membros – Aline, Ana Flávia, Ana Maria, Assis, Daniela, Danielle, Julia, Marcos, Martha, Nattália, Silvia, Simone, Paula, Renata e Vagner, e de histórias!! Pertencer a este grupo é um orgulho pra mim, pois perto de vocês me sinto forte e segura. Obrigada pela ajuda incondicional de

vocês para a realização desse estudo! Saibam que TODOS vocês contribuíram para esse trabalho!!

Aos amigos Alessandra Oliveira, Assis Júnior, Daniela Otero, Danielle Camisasca, Elisa Diblasi e Silvia Paula, por sempre se preocuparem comigo e me incentivarem. Sinto falta de estar com vocês com mais frequência. Obrigada e obrigada!!

Às minhas amigas inicialmente do INCA e hoje amigas de vida, Ana Carolina Ferreira, Franciane Gomes, Gabriela Vera, Lauana Lemos e Tállita Meciany, pelo companheirismo diante das disciplinas do Programa, das dúvidas, das incertezas do caminho e pela ajuda de sempre... desde o dia do processo de seleção para o mestrado!!! Obrigada pela lealdade e cumplicidade de sempre! E também aos companheiros de luta Letícia Casado, Rejane Reis, André Leonardo, Fernanda Souza, Sérgio Amaro, Bruno Lopes, Júlio Show, Ingrid Sardou e mais recentemente Ricardo Cortez, Taciana Padilha e Cintia Gomez.

Aos membros do Programa de Carcinogênese Molecular (PCM) do Centro de Pesquisas do INCA – Alda, Bruno, Daniel, Diego, Eduardo, Fernando, Flávia, Isabela, Juan, Leão, Lilian, Luis Felipe, Mariana, Marina, Natália, Patrícia, Paula, Pedro, Sheila, Simone e Tatiana pelas colaborações incansáveis e pelos questionamentos sempre instigantes frente aos resultados desta pesquisa. E as funcionárias do PCM, Andrea, Denise, Fernanda e Monique por sempre se disponibilizarem a me ajudar no laboratório. Um agradecimento especial a Diego Camuzi, Flávia Carvalho, Monique Lopes e Simone Guaraldi, pela dedicação e paciência frente a infinitos géis de agarose, análises estatística, pirosequenciamentos e formatações de tese, meu muito obrigada!

À Maria Thereza do Banco Nacional de Tumores, Dr^a. Luciana Wernersbach e Dr^a Fabiana Resende pela colaboração junto a Divisão de Patologia (DIPAT) e a Prsicila Valerde da DIPAT pelo auxílio no processamento do material parafinado e imuno-histoquímica.

À Lucinéa e Claudionor do arquivo médico do HCl pela ajuda com os muitos prontuários.

Ao Ministério da Saúde pela bolsa de estudo concedida e à FAPERJ pelo auxílio financeiro fundamental para o desenvolvimento dessa pesquisa.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xi
LISTAS DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
LISTA DE SÍMBOLOS	xii
RESUMO	xviii
ABSTRACT	ixx
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO ...	1
1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO	3
1.3 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE	13
1.3.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS, HPV NEGATIVO	14
1.3.2 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS, HPV POSITIVO	16
1.3.3 SISTEMA DE ESTADIAMENTO TNM PARA O CCEO	18
1.3.4 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO DO CCEO	21
1.3.5 DETECÇÃO DO HPV	23
1.3.6 PREVENÇÃO E RASTREAMENTO DO CCEO	25
1.4 EPIGENÉTICA	27
1.4.1 METILAÇÃO DO DNA	29
1.4.2 LINE-1	32
1.5 JUSTIFICATIVA	34
2 OBJETIVOS	36
2.1 GERAL	36
2.2 ESPECÍFICOS	36
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	37
3.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	38
3.2.1 GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA OMS	39
3.2.2 CLASSIFICAÇÃO DESCRITIVA POR BRODERS	40
3.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	41
3.3.1 REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	41

3.3.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA	43
3.4 ANÁLISE MOLECULAR	44
3.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINADO	44
3.4.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA	45
3.4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – <i>β-Actina</i>	45
3.4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (PCRQ) – E6 HPV 16	47
3.4.5 STATUS DO HPV	48
3.5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO	48
3.5.1 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO	48
3.5.2 ANÁLISE DE METILAÇÃO GLOBAL PELA AVALIAÇÃO DE LINE-1	49
3.5.3 ANÁLISE DE METILAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DA ASSINATURA EPIGENÉTICA DA INFECÇÃO PELO HPV	51
3.5.4 ANÁLISE DA METILAÇÃO DE SÍTIOS CPG POR PIROSEQUENCIAMENTO	52
3.5.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE METILAÇÃO	53
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
3.6.1 ANÁLISES DESCRITIVA E DE ASSOCIAÇÃO	54
3.6.2 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	55
4 RESULTADOS	57
4.1 PERFIL DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	57
4.2 HISTOPATOLÓGICOS	59
4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA P16	60
4.4 MOLECULARES	63
4.4.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA <i>β-ACTINA</i>	63
4.4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA PARA E6 HPV 16	64
4.5 STATUS DO HPV	65
4.6 ANÁLISES EPIGENÉTICAS	66
4.6.1 PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL DE LINE-1	66
4.6.2 PERFIL DE METILAÇÃO PARA A ASSINATURA EPIGENÉTICA PADRÃO DA INFECÇÃO PELO HPV	67

4.7 COMPARAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES COM OS DESFECHOS ESTUDADOS	69
4.7.1 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO AO ESTADIAMENTO CLÍNICO	69
4.7.2 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO À IMUNOEXPRESSÃO DE P16	70
4.7.3 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE E6 DO HPV 16.....	71
4.7.4 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO AO STATUS DE HPV	71
4.7.5 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO À METILAÇÃO DE LINE-1.....	72
4.7.6 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO À ASSINATURA EPIGENÉTICA DO HPV ...	74
4.8 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	80
4.8.1 SOBREVIVÊNCIA GLOBAL	80
4.8.2 SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA	83
4.8.3 SOBREVIVÊNCIA ESPECÍFICA POR CÂNCER	85
5 DISCUSSÃO	88
6 CONCLUSÕES	100
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
8 ANEXOS	124
8.1 PARECER DO CEP - INCA	124
8.2 APOIO FINANCEIRO - APQ1 FAPERJ	130
8.3 FICHA DE REGISTRO.....	139
8.4 MATERIAL COMPLEMENTAR	140
8.4.1 PERFIL DOS PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE HPV POSITIVOS: N=21 (6,1%).....	140
8.5 DETALHAMENTO DOS CASOS HPV+	144
8.5.1 ESQUEMA DEMONSTRANDO OS CASOS HPV POSITIVOS FRENTE AS DIFERENTES TÉCNICAS UTILIZADAS	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Tipos de Papilomavírus Humano por lesão selecionada	4
Tabela 1.2: Distribuição dos genes do vírus do papiloma humano de acordo com a expressão gênica e a função	6
Tabela 1.3: Comparação de CCEO HPV positivo e HPV negativo	18
Tabela 1.4: Estadiamento clínico do CCEO de acordo com o status de p16... ..	20
Tabela 3.1: Dados sociodemográficos, clínico-patológicos e de acompanhamento coletados da população de estudo	37
Tabela 3.2: Gradação histopatológica proposta pela OMS, baseada na diferenciação celular	39
Tabela 3.3: Classificação descritiva para o CCE	40
Tabela 3.4: Protocolo utilizado na reação imuno-histoquímica referente ao anticorpo aplicado na presente população de estudo	43
Tabela 3.5: Condições da reação de PCR: região amplificada, oligonucleotídeos específicos, temperatura de anelamento e o tamanho do produto amplificado	46
Tabela 3.6: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores da reação de PCRq	47
Tabela 3.7: Sequência dos primers utilizados na análise de LINE-1 por pirosequenciamento	50
Tabela 3.8: Sequências dos primers utilizados nas análises por pirosequenciamento	51
Tabela 4.1: Características sociodemográficas e clínico-patológicas dos pacientes (n=346)	58
Tabela 4.2: Características histopatológicas dos pacientes (n=346)	59
Tabela 4.3: Resultado imuno-histoquímico da proteína p16 nos tumores avaliados (n=346)	61
Tabela 4.4: Resultado da reação de PCR do gene <i>β-actina</i> nos tumores avaliados (n=346)	63
Tabela 4.5: Resultado da reação de PCRq do gene <i>E6</i> do HPV 16 nos tumores avaliados (n=335)	65
Tabela 4.6: <i>Status</i> de HPV nos tumores avaliados (n=346)	65

Tabela 4.7: Perfil de metilação global de LINE-1 nos casos de CCEO (n=346)	67
Tabela 4.8: Perfil de metilação da assinatura epigenética do HPV nos casos de CCEO (n=216).....	69
Tabela 4.9: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação ao estadiamento clínico (n=346).....	69
Tabela 4.10: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação à imunexpressão de p16 (n=346).	70
Tabela 4.11: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação à presença de E6 (n=335)	71
Tabela 4.12: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação ao <i>status</i> de HPV (n=346)	71
Tabela 4.13: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação a metilação mediana de LINE-1 (n=346)	72
Tabela 4.14: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação a assinatura epigenética do HPV (n=216)	74
Tabela 4.15: Frequências absolutas e relativas dos genes da assinatura epigenética padrão em relação ao <i>status</i> de HPV (n=216).....	76
Tabela 4.16: Análise da sobrevida global: Avaliação do risco de ocorrência de óbito no CCEO em função das características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares	82
Tabela 4.17: Análise da sobrevida livre de doença: Avaliação do risco de ocorrência de recidiva no CCEO em função das características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares.....	84
Tabela 4.18: Análise da sobrevida específica: Avaliação do risco de ocorrência de óbito por câncer de CCEO em função das características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Anatomia da faringe e sítios da orofaringe	2
Figura 1.2: Mapa genômico do HPV.....	5
Figura 1.3: Progressão mediada pelo HPV para câncer do colo de útero.....	10
Figura 1.4: O HPV na carcinogênese da orofaringe é ilustrado.....	12
Figura 1.5: Via patogênica do HPV no CCEO	24
Figura 1.6: CCEO associado ao HPV.....	25
Figura 1.7: Mecanismos epigenéticos relacionados à regulação da expressão gênica.....	28
Figura 1.8: Metilação do DNA.....	29
Figura 1.9: Padrões de metilação alterados na tumorigênese.....	31
Figura 3.1: Gradação histopatológica da OMS.....	40
Figura 3.2: CCE de amígdala demonstrando testes para HPV	43
Figura 3.3: Foto de eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar a amplificação do fragmento do gene <i>β-actina</i> (250 pb)	46
Figura 3.4: Princípio básico da conversão de bissulfito onde as citosinas não metiladas são convertidas em uracila.....	49
Figura 3.5: Foto de eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar a amplificação do fragmento do elemento transponível LINE-1 (108 pb)	50
Figura 4.1: Gradação histopatológica da OMS.....	60
Figura 4.2: Classificação descritiva de Broders.....	60
Figura 4.3: Fotomicrografias imuno-histoquímica do anticorpo p16	62
Figura 4.4: Foto de eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar a amplificação do fragmento do gene <i>β-actina</i> (250 pb)	63
Figura 4.5: Foto da curva de amplificação do gene <i>E6</i> do HPV 16 (120 pb)...	64
Figura 4.6: Foto de eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar a amplificação do fragmento do elemento transponível LINE-1 (108 pb)	65
Figura 4.7: Foto de eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar a amplificação do fragmento dos genes da assinatura epigenética padrão do HPV	68

Figura 4.8: Índice cumulativo de metilação de LINE-1 em CCEO negativo para HPV (52,95%; n=325) e CCEO positivo para HPV (63,65%; n=21) representado no gráfico de <i>boxplot</i> ($p<0,0001$) (n=346)	73
Figura 4.9: Análise da curva ROC da metilação de LINE-1 em CCEO.....	74
Figura 4.10: Índice cumulativo de metilação da assinatura epigenética padrão do HPV em CCEO negativo para HPV (78,07%; n=195) e CCEO positivo para HPV (62,62%; n=21) representado no gráfico de <i>boxplot</i> ($p<0,0001$) (n=216)..	75
Figura 4.11: Análise da curva ROC da assinatura epigenética padrão do HPV em CCEO	76
Figura 4.12: Índice cumulativo de metilação do modelo com os quatro sítios CpG para assinatura epigenética do HPV em CCEO negativo para HPV (82,60%; n=195) e CCEO positivo para HPV (61,77%; n=21) representado no gráfico de <i>boxplot</i> ($p<0,0001$) (n=216)	77
Figura 4.13: Análise da curva ROC do modelo com os quatro sítios CpG da assinatura epigenética do HPV em CCEO	78
Figura 4.14: Índice cumulativo de metilação do modelo com os dois sítios CpG para assinatura epigenética do HPV em CCEO negativo para HPV (89,07%; n=195) e CCEO positivo para HPV (60,04%; n=21) representado no gráfico de <i>boxplot</i> ($p<0,0001$) (n=216).....	79
Figura 4.15: Análise da curva ROC do modelo com os dois sítios CpG da assinatura epigenética do HPV em CCEO	80
Figura 4.16: Curvas de sobrevida global da população com CCEO pelo método <i>Kaplan-Meier</i> em função das características sociodemográficas e clínico-patológicas	81
Figura 4.17: Curvas de sobrevida livre de doença da população com CCEO pelo método <i>Kaplan-Meier</i> em função das características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares.....	83
Figura 4.18: Curvas de sobrevida específica da população com CCEO pelo método <i>Kaplan-Meier</i> em função das características sociodemográficas e clínico-patológicas.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS

5mC	5-metilcitosina
APQ1	Auxílio à Pesquisa
ATE	Tampão de eluição
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCECP	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
CCEO	Carcinoma de células escamosas de orofaringe
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
-CH₃	Grupamento metil
CpG	5'—Citosina—fosfato—Guanina—3'
CPQ	Centro de Pesquisas
DIPAT	Divisão de Patologia
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMTs	DNA metiltransferases
E	<i>Early</i>
E	Éxon
ENE	Extensão extranodal
FAPERJ	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
G	<i>Gap</i>
HPV	Papiloma vírus humano
HR	<i>Hazard ratio</i>
IC	Intervalo de confiança
IHQ	Imuno-histoquímica
IMM	Índice médio de metilação
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
ISH	Hibridização <i>in situ</i>
IST	Infecção sexualmente transmissível
L	<i>Late</i>
LCR	<i>Long control region</i>
LINE-1	Longo elemento nuclear intercalado-1

LINES	<i>Long interspersed nuclear elements</i>
M	Mitose
N/C	Relação núcleo/citoplasma
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open reading frames</i>
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCRq	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
pRb	Proteína retinoblastoma
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
S	Síntese
SAH	S-adenosil hocisteína
SAM	S-adenosil metionina
SAMe	S-adenosil-L-metionina
SEC	Sobrevida específica por câncer
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SG	Sobrevida global
SINEs	<i>Short interspersed nuclear elements</i>
SLD	Sobrevida livre de doença
RNA	Ácido ribonucléico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNM	Sistema de Estadiamento de Neoplasias Malignas “ <i>tumor-node-metastasis</i> ”
UICC	União Internacional de Combate ao Câncer

LISTA DE SÍMBOLOS

NaCl	Cloreto de sódio
g	grama
mg	Miligrama
μL	Microlitro
mL	Mililitro
rpm	Rotação por minuto
°C	Grau Celsius
nm	Nanômetro
μg	Micrograma
μm	Micrômetro
ng	Nanograma
M	Molar
mM	milimolar
ppm	Partes por milhão
U	Unidade



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE EM PACIENTES DO
INCA: CARACTERÍSTICAS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E
MOLECULARES**

RESUMO

Tese de Doutorado

Luisa Aguirre Buexm

O câncer da orofaringe tem incidência crescente em vários continentes. O carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEO) é responsável por 90-95% deste tumor. Além do consumo de tabaco e álcool, alguns tipos de Papilomavírus Humano (HPV) foram associados ao CCEO e, nesses casos, estão relacionados à apresentação clínica e comportamento biológico distintos. Recentemente, vários estudos utilizaram abordagens gene-específico e genoma de varredura para examinar alterações epigenéticas, como a metilação do DNA em CCEO, demonstrando a hipermetilação do promotor em CCEO HPV positivo. Portanto, este estudo tem como objetivo estabelecer o perfil dos pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe, diagnosticados no INCA de 1999 a 2010, quanto às características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares. Para isso, foram coletados registros de 346 pacientes, imunexpressão da proteína p16, PCRq para HPV16 *E6* e metilação de LINE-1, *HLTF-AS1*, *FAM217B* e *B3GALT6* foram realizadas, avaliadas e submetidas a análises bivariada e de sobrevida. Homens brancos, com idade entre 41-60 anos, etilistas e tabagistas foram os mais afetados. Predominaram tumores moderadamente diferenciados, em estadiamento clínico IV e tratados com radioterapia. 84 casos de progressão da doença e 106 casos de recidiva foram identificados. 271 pacientes vieram à óbito, destes 256 tiveram sua morte confirmada por câncer. Os casos negativos para a imuno-expressão de p16 (90,8%) e para PCRq do *E6* HPV16 (88,1%) foram predominantes. Em relação ao *status* de HPV, apenas 21 casos (6,1%) foram classificados como HPV positivos. Os níveis de metilação da LINE-1 e dos genes da assinatura epigenética (*HLTF-AS1*, *FAM217B* e *B3GALT6*) foram em grande parte heterogêneos. Os casos HPV positivos apresentam-se hipermetilados para LINE-1 e hipometilados para *HLTF-AS1*, *FAM217B* e *B3GALT6*. Foram observadas associações entre estadiamento clínico avançado e tabagismo ($p=0,013$), intenção de tratamento paliativo ($p<0,0001$), recidiva ($p=0,008$) e óbito ($p=0,001$). Houve associação entre o *status* de HPV com o perfil de metilação de LINE-1 ($p<0,0001$) e com a assinatura epigenética do HPV ($p<0,0001$). A sobrevida global média (SG) foi de 20,79 meses. Tiveram uma SG menor os pacientes etilistas ($p=0,017$) e com tumores bem diferenciados ($p=0,012$). Já a sobrevida livre de doença (SLD) média foi de 17,60 meses. O grupo de pacientes tabagistas ($p=0,038$), que não realizaram terapia adjuvante ($p=0,005$) e com assinatura epigenética positiva para HPV ($p=0,041$) apresentou SLD menor. Em relação à sobrevida específica por câncer (SEC) a média foi de 20,61 meses. Os pacientes submetidos a tratamento com intenção paliativa ($p<0,0001$) e em estadiamento clínico avançado ($p<0,0001$) apresentaram uma menor SEC. O perfil de pacientes com CCEO analisados não difere da literatura para países em desenvolvimento. *Status* HPV negativo predominou, caracterizando que a carcinogênese do CCEO no INCA está associada aos fatores de risco clássicos. Hábitos, tratamento e estadiamento são fatores prognósticos importantes nesta população, mostrando a agressividade do CCEO.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**OROPHARYNGEAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN INCA PATIENTS:
SOCIODEMOGRAPHIC, CLINICAL-PATHOLOGICAL AND MOLECULAR
CHARACTERISTICS**

ABSTRACT

PhD Thesis

Luisa Aguirre Buexm

Oropharyngeal cancer has increasing incidence in several continents. Oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC) accounts for 90-95% of this tumor. In addition to the consumption of tobacco and alcohol, some Human Papillomavirus (HPV) types have been associated with OSCC and in these cases, are related to distinct clinical presentation and biological behavior. Recently, several studies have used gene-specific and genome-wide approaches to examine epigenetic changes such as DNA methylation in OSCC, Demonstrating promoter hypermethylation in HPV-positive OSCC. Therefore, this study aims to establish the profile of patients with OSCC diagnosed at INCA from 1999 to 2010 regarding socio-demographic, clinical-pathological and molecular characteristics. For this, records from 346 patients were collected, immunoexpression of p16 protein, qPCR for HPV16 E6 and LINE-1 methylation were performed, evaluated and submitted to bivariate and survival analysis. White males, aged between 41-60 years, alcohol-drinkers and smokers were most affected. Predominated moderately-differentiated tumors, clinical stage IV and treated with radiotherapy. 84 were identified cases of disease progression and 106 cases of recurrence. 271 came to death, of these 256 patients had confirmed death from cancer. Negative cases were predominant for p16 immunoexpression (90.8%) and for E6 HPV16 qPCR (88.1%). Regarding HPV status, only 21 cases (6.1%) were classified as HPV positive. The methylation levels of LINE-1 and epigenetic signature genes (*HLTF-AS1*, *FAM217B* and *B3GALT6*) were largely heterogeneous. HPV-positive cases are hypermethylated to LINE-1 and hypomethylated to *HLTF-AS1*, *FAM217B* and *B3GALT6*. Associations between advanced clinical staging and smoking ($p=0.013$), intention to treatment palliative ($p<0.0001$), recurrence ($p=0.008$) and death ($p=0.001$) were observed. There was an association between the HPV status with the methylation profile of LINE-1 ($p<0.0001$) and the epigenetic signature of HPV ($p<0.0001$). Mean overall survival (OS) was 20.79 months. There were lower SG patients with alcohol-drinkers ($p=0.017$) and with well-differentiated tumors ($p=0.012$). Mean disease-free survival (DFS) was 17.60 months. The group of smokers ($p=0.038$), who didn't undergo adjuvant treatment ($p=0.005$) and with an epigenetic signature positive for HPV ($p=0.041$) presented lower DFS. In relation to cancer-specific survival (CSS) the mean was 20.61 months. Patients submitted to treatment with palliative intent ($p<0.0001$) and in advanced clinical stage ($p<0.0001$) presented a lower CSS. The profile of OSCC patients analyzed doesn't differ from the literature for developing countries. Negative-HPV status predominated, characterizing that the carcinogenicity of OSCC in INCA is associated with classic risk factors. Habits, treatment and staging are important prognostic factors in this population, showing the aggressiveness of OSCC.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO

O câncer de cabeça e pescoço, que inclui tumores que surgem da cavidade oral, orofaringe, laringe, hipofaringe e trato nasossinusal, representa um grave problema de saúde em muitas partes do mundo e se classifica como o sexto câncer mais frequente em todo o mundo (FERLAY *et al.*, 2015). Estão ligadas por características comuns, incluindo uma predominância masculina, entre a 5ª e 6ª década de vida, com uma forte ligação etiológica com consumo prévio de tabaco ou uso de álcool (STURGIS & ANG, 2011) e uma semelhança histopatológica (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Aproximadamente 90% dos casos são histopatologicamente carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP).

Dos casos de CCECP, 30% são representados pelo carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEO). A orofaringe é a porção de continuidade da faringe que se prolonga do plano da superfície superior do palato mole até a superfície superior do osso hióide (ou valécula). Contempla a base da língua, incluindo a amígdala lingual; a superfície inferior (anterior) do palato mole e a úvula; os pilares amigdalianos anterior e posterior com as amígdalas palatinas; o sulco glossotonsilar; e as paredes laterais e posteriores da faringe (ELREFAEY *et al.*, 2014) (**Figura 1.1**).

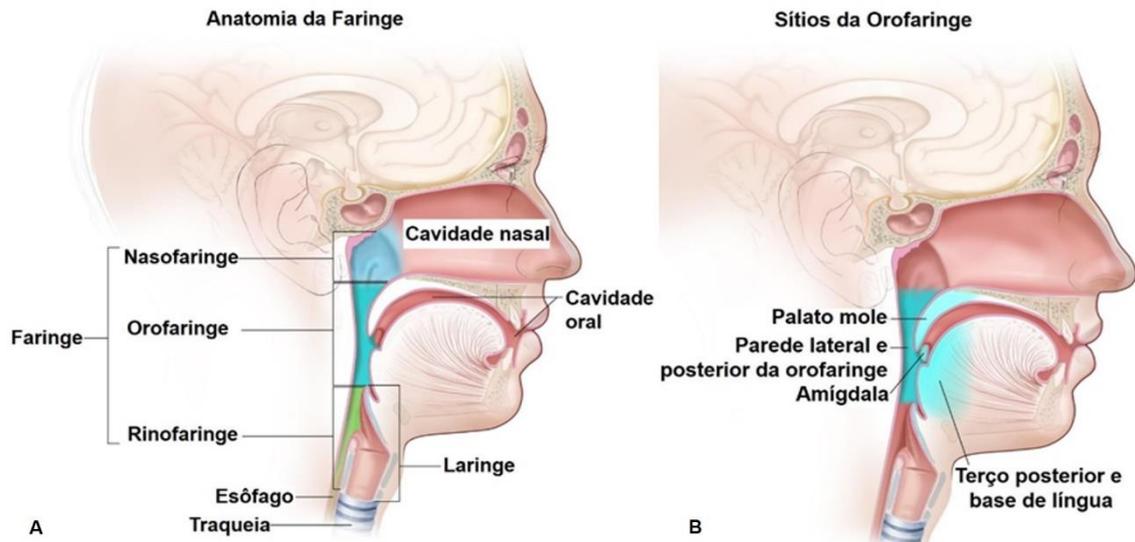


Figura 1.1: **A** *Anatomia da faringe*. As três partes da faringe são nasofaringe, orofaringe e hipofaringe. **B** *Sítios da orofaringe*. A orofaringe inclui o palato mole, a parede lateral e posterior da orofaringe, as amígdalas e o terço posterior e base de língua. Adaptado de <https://www.cancer.gov/>.

A estimativa anual mundial do câncer de orofaringe, incluído com outras faringes, é de aproximadamente 142.387 casos incidentes e 96.105 mortes (FERLAY *et al.*, 2015) e o CCEO representa aproximadamente 123.000 casos incidentes diagnosticados mundialmente a cada ano (PAKIN *et al.*, 2005).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer estimou, para o ano de 2018, 14.700 novos casos diagnosticados de câncer de boca e orofaringe (11.200 em homens e 3.500 em mulheres). Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens e 3,28 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018).

O consumo moderado e intenso de álcool e tabaco representam os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CCECP e podem atuar de forma sinérgica aumentando o risco dessa malignidade (WRIGHT & MORGAN, 2013). Nos últimos anos, a incidência da CCECP tem diminuído nos países desenvolvidos devido à redução da exposição ao tabaco. No entanto, há um aumento concomitante na incidência de CCEO como resultado da infecção por tipos de alto risco do papiloma vírus humano (HPV) (HUBER & TANTIWONGKOSI, 2014; CASTELLSAGUE *et al.*, 2016).

O CCEO associado ao HPV de alto risco é uma forma epidemiológica e clínico-patológica diferente de CCECP (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Embora praticamente todos os cânceres do colo uterino sejam induzidos pelo HPV, o CCEO possui duas etiologias distintas: consumo de tabaco e álcool ou infecção por HPV, o que pode coexistir (MAXWELL *et al.*, 2010). Além de afetar predominantemente homens jovens e tipicamente não fumantes (ELREFAEY *et al.*, 2014), o HPV de alto risco está presente em 45-90% dos CCEO, mas este percentual pode variar drasticamente de acordo com a localização geográfica (FURLAN *et al.*, 2017; LUPATO *et al.*, 2017).

1.2 PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Atualmente, estima-se que 50% dos indivíduos no mundo ou 450 milhões de pessoas sejam infectados na região anogenital pelo HPV, tornando assim a IST (infecção sexualmente transmissível) mais comum (CAVENAGHI *et al.*, 2013). O HPV tem sido detectado em várias lesões de pele e mucosa, sendo mais conhecido por seu papel no desenvolvimento dos cânceres da região anogenital (especialmente o de colo de útero, mas também de ânus, vulva, vagina e pênis). Além disso, ao longo da última década, uma forte ligação entre HPV e CCEO foi estabelecida (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Mais de 150 subtipos diferentes de HPV foram identificados, e vêm sendo associados a lesões malignas e, principalmente, benignas de mucosa e pele (CASTRO *et al.*, 2009). Pelo menos os seguintes 25 tipos têm sido detectados em lesões de boca e orofaringe: 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 40, 45, 52, 55, 57, 58, 59, 69, 72, 73 (NEVILLE *et al.*, 2016). Exemplos de lesões relacionadas ao HPV e seus correspondentes tipos virais estão listados na tabela a seguir (**Tabela 1.1**). Os tipos de HPV de alto risco são associados à displasia e ao carcinoma de células escamosas. Em especial, a detecção de HPV 16 em células epiteliais está associada a um risco quase quatro vezes maior de câncer oral e a um aumento de risco superior a 14 vezes de CCEO. O HPV 16 foi identificado em mais de 90% dos CCEO HPV positivos (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Tabela 1.1: Tipos de Papilomavírus Humano por lesão selecionada.

Sítio de predileção	Lesão	Principais tipos de HPV	Outros tipos de HPVs relatados
Mucosa oral / cabeça e pescoço	<i>Papiloma</i>	6, 11	
	<i>Papilomatose respiratória recorrente</i>	6, 11	
	<i>Papiloma fungiforme nasossinusal</i>	6, 11	16, 57
	<i>Papiloma invertido nasossinusal</i>	6, 11	16, 18, 57
	<i>Hiperplasia epitelial focal</i>	13, 32	1, 6, 11, 16, 18, 55
	<i>Carcinoma de células escamosas de orofaringe</i>	16	18, 26, 33, 35, 45, 52, 58
	<i>Papiloma conjuntival</i>	6, 11, 16	
Pele	<i>Verruga vulgar</i>	2	1, 4, 6, 7, 11, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 75-77
	<i>Verruga plana</i>	3, 10	2, 5, 26-29, 38, 41, 49, 75, 76
	<i>Verruga palmo-plantar</i>	1, 4	2, 45, 57, 60, 63, 65, 66
	<i>Verruga de açougueiro</i>	2, 7	1, 3, 4, 10, 28
Região anogenital	<i>Condiloma acuminado</i>	6, 11	2, 16, 18, 31, 33, 35, 39-45, 51-56, 58, 59, 66, 68, 70
	<i>Neoplasia intra-epitelial</i>	6, 11, 16, 18, 31, 33	26, 35, 39, 45, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 70, 73, 82
	<i>Carcinoma de células escamosas do colo de útero</i>	16, 18	6, 11, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68

Fonte: Modificada de NEVILLE *et al.*, 2016.

Os vírus do papiloma humano pertencem à família *Papillomaviridae* (BIRD *et al.*, 2008). São pequenos, medindo aproximadamente 55 nm de diâmetro, e infectam o epitélio cutâneo e/ou oral em vários vertebrados (PYEON *et al.*, 2009). São vírus com genoma constituído por ácido desoxirribonucléico (DNA) e apresentam a característica de não serem capazes de codificar as enzimas que são responsáveis pela própria replicação (TOVAR *et al.*, 2008). Portanto, eles têm desenvolvido estratégias de sobrevivência que envolvem a desregulação do ciclo celular das células do hospedeiro, resultando no aumento da proliferação celular e desenvolvimento de verrugas genitais ou câncer, e podem afetar vários sítios, principalmente pele das extremidades, pele e mucosa genital, orofaringe e mucosa oral (FELLER *et al.*, 2009; BETIOL *et al.*, 2016).

HPV são vírus não-envelopados com capsídeo icosaédrico que replica seus genomas dentro do núcleo das células do hospedeiro infectado (LONGWORTH & LAIMINS, 2004). Possuem um genoma composto de 8.000

pares de base (**Figura 1.2**), que é constituído por aproximadamente oito *open reading frames* (ORF), possuindo pelo menos seis genes que se expressam precocemente e dois genes que se expressam tardiamente, sendo denominados respectivamente de E (*Early* - Precoce) e L (*Late* - Tardio) (MUÑOZ *et al.*, 2006; LUBAMBO *et al.*, 2008).

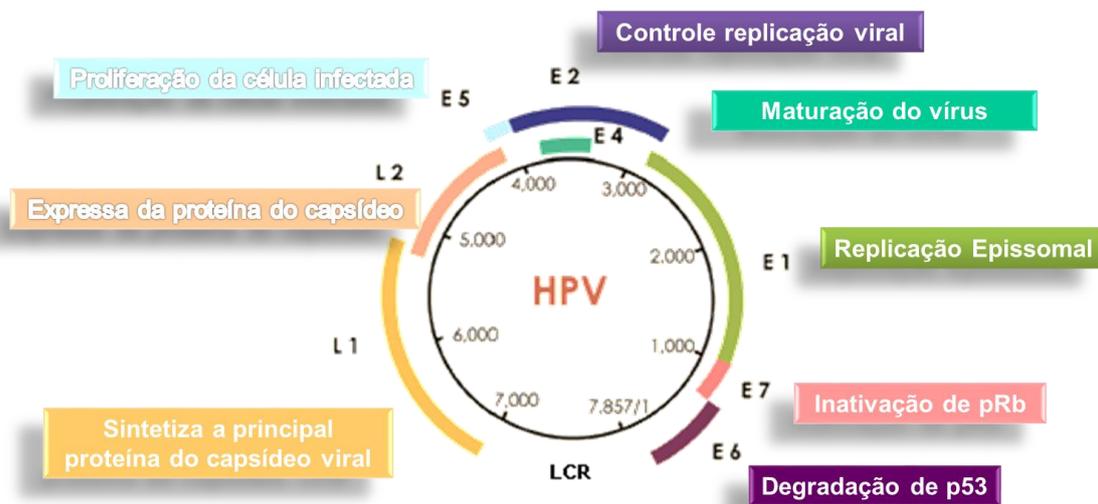


Figura 1.2: Mapa genômico do HPV. Adaptado de MUÑOZ *et al.*, 2006.

A região E, expressa logo após a infecção, codifica as proteínas envolvidas na indução e regulação da síntese de DNA e é formada pelos genes *E1* associado à replicação viral, *E2* associado à transcrição e replicação, *E4* associado à maturação viral e à alteração da matriz intracelular e *E5*, *E6* e *E7* envolvidos na transformação celular (SOUTO *et al.*, 2005). A região L, expressa em estágios posteriores da infecção, codifica as proteínas do capsídeo icosaédrico viral e é formada pelos genes *L1* e *L2* (MANNARINI *et al.*, 2009) (**Tabela 1.2**). A proteína *L1* é expressa após a proteína *L2* no ciclo de replicação viral e medeia a montagem dos vírions (partículas virais completas) de HPV. A proteína *L2* interage com a proteína *E2*, facilita o transporte da proteína *L1* para o núcleo e tem um papel no encapsulamento do DNA viral (FELLER *et al.*, 2009). Entre as regiões E e L localiza-se a LCR (*long control region*), uma sequência entre o fim de *L1* e o começo de *E6* que não codifica proteína, mas mantém o controle da transcrição do vírus, importante no controle da replicação viral e transcrição de genes virais e celulares (SOUZA &

GONÇALVES, 2009). Nessa região, existem sequências estimuladoras e repressoras da transcrição viral, além da origem de replicação (FERRAZ *et al.*, 2013; BETIOL *et al.*, 2016).

Tabela 1.2: *Distribuição dos genes do vírus do papiloma humano de acordo com a expressão gênica e a função.*

Expressão Gênica	Genes	Função
Precoce	<i>E1</i>	Replicação epissomal do vírus
	<i>E2</i>	Regula negativamente as funções das proteínas E6 e E7
		Controle da transcrição e replicação
	<i>E4</i>	Produz proteína secundária do capsídeo viral
		Maturação do vírus e alteração da matriz intracelular
	<i>E5</i>	Induz proliferação da célula infectada pelo vírus
	<i>E6</i>	Provoca destruição da proteína p53 da célula hospedeira via ubiquitina e mantém o comprimento da telomerase acima de seu ponto crítico, protegendo a célula da apoptose
<i>E7</i>		Inativa a proteína pRb da célula hospedeira impedindo o bloqueio do ciclo celular
Tardia	<i>L1</i>	Sintetiza a proteína principal do capsídeo viral
	<i>L2</i>	Expressa a proteína secundária do capsídeo viral

Fonte: Modificada de BAGARELLI & OLIANI, 2004.

No núcleo da célula hospedeira, o DNA do HPV pode assumir duas formas, de acordo com o padrão de infecção: a epissomal (latência e produtiva) e a integrada (transformante). Na forma epissomal, o DNA viral permanece circular no núcleo da célula do hospedeiro e é identificado em lesões benignas. Para que ocorra a integração do DNA-HPV ao genoma humano é necessário o rompimento da região *E1–E2*, com desregulação do controle transcricional dos genes virais (SOUTO *et al.*, 2005). Após a entrada na célula hospedeira, os

genes *E1* e *E2* são expressos primeiro e codificam proteínas requeridas para a replicação do DNA viral (GANGULY & PARIHAR, 2009). Estas proteínas (*E1* e *E2*) estão vinculadas à origem da replicação viral, ao recrutamento de proteínas que medeiam a replicação do DNA viral, regulam a expressão do gene viral e são também responsáveis por manter o DNA viral como um epissoma. Além disso, regulam um número estável de 20 a 100 cópias de DNA do HPV por célula. A proteína *E2* facilita a separação do genoma HPV durante a divisão celular, resultando na distribuição do DNA do HPV nas células filhas, e está envolvido na promoção da montagem do vírion. Além disso, *E2* tem a capacidade de reprimir a atividade do promotor *E6/E7* (FELLER *et al.*, 2009). A transcrição de *E1* e *E2* causa repressão de *E6* e *E7*, permitindo a função de supressão tumoral das proteínas retinoblastoma (pRb) e p53, mantendo a homeostase epitelial. Se não há transcrição de *E1* e *E2*, os oncogenes *E6* e *E7* estarão disponíveis para se ligarem, respectivamente, às proteínas p53 e pRb, inibindo a ação desses fatores celulares (SOUZA & GONÇALVES, 2009). Os genes *E6* e *E7*, além de envolvidos na manutenção epissomal do genoma do HPV, codificam oncoproteínas que podem induzir a transformação da célula hospedeira (GANGULY & PARIHAR, 2009). A expressão desregulada dos genes *E6* e *E7* do HPV em células da camada basal leva a uma maior instabilidade cromossomial nas respectivas células nos estágios iniciais de displasia, o que não é suficiente para o completo fenótipo maligno. Outros eventos genéticos são necessários para a progressão de uma lesão causada por HPV para câncer (WOODMAN *et al.*, 2007).

A proteína *E6* do HPV de alto risco é suficiente para induzir e manter a transformação celular e tem sido descrita por se ligar à proteína p53 e causar sua degradação via proteassoma 26S, resultando em inativação da p53, o que compromete a integridade do DNA replicado, causando danos no DNA e instabilidade cromossomial. Essas anormalidades resultam em proliferação celular ou desenvolvimento de tumor. A oncoproteína *E6* em HPV de baixo risco também pode se ligar à proteína p53, mas com muito menos afinidade, e não causa sua degradação. O aumento da expressão de *E6* causa: transformação da célula hospedeira, immortalização da célula, proliferação celular, replicação do DNA defeituoso e acúmulo de mutações e inibição da

resposta imune das células tumorais (GANGULY & PARIHAR, 2009). A oncoproteína E7 se liga a pRb hipofosforilada e inativa sua função por prevenir a ligação de pRb ao fator de transcrição E2F, podendo também degradá-la. O estado de fosforilação da pRb é regulada através do ciclo celular, estando hipofosforilada em G0 e G1 e fosforilada durante S, G2 e M (HOWLEY, 2006). Em células com aumento da expressão da proteína E7, a checagem do controle da transição da fase G1 para S é perdido e as células continuam a atravessar o ciclo celular levando a uma proliferação celular descontrolada. E6 e E7 podem imortalizar células humanas independentemente, mas a eficiência aumenta quando elas são expressas juntas (GANGULY & PARIHAR, 2009). Acredita-se que a integração do genoma do HPV de alto risco representa um evento significativo na patogênese do câncer do colo de útero associado com progressão de lesões pré-malignas para câncer invasivo. Entretanto, a integração não é uma parte normal do ciclo de vida do HPV, caracterizada por grandes deleções do DNA viral acoplado com uma descontrolada expressão das oncoproteínas E6 e E7. No câncer oral, a infecção pelo HPV ocorre em uma forma predominante epissomal e raramente na forma integrada (SOUZA & GONÇALVES, 2009).

HPV *E4* é expresso somente na fase posterior do ciclo de vida viral quando partículas virais estão sendo montadas. A proteína E4 é necessária para a fase produtiva do ciclo de vida do HPV, pois modula a amplificação do DNA do HPV e a expressão estrutural do gene. Já a proteína E5 participa na amplificação do DNA do HPV e tem a capacidade de promover reação imune, pois está associado com baixa regulação da comunicação da junção intercelular. Além disso, é importante no curso inicial da infecção e impede a apoptose, mantendo o dano do DNA (FELLER *et al.*, 2009; GANGULY & PARIHAR, 2009).

Acredita-se que o HPV infecte epitélios através de abrasões ou microlacerações da pele e mucosa, durante a relação sexual, auto-inoculação ou pelo contato com objetos contaminados, permitindo o acesso do vírus às células da camada basal, responsáveis pela renovação epitelial por preservar a capacidade mitótica. A infecção pelo HPV inicia quando o vírus entra nas células epiteliais basais (células alvo do HPV) através de um processo lento de

endocitose, a partir da ligação a um receptor específico na superfície das células basais. Esta ligação é mediada por heparano sulfato, sendo a integrina alfa 6 identificada como um possível receptor. Durante o processo de infecção celular, ocorre a perda do capsídeo e transporte do genoma para o núcleo, onde vai persistir como um DNA extracromossomal (epissomal) (FERRAZ *et al.*, 2013).

O ciclo de vida do HPV é vinculado à diferenciação das células epiteliais do hospedeiro, sendo possível a identificação de estágios. O processo inicia-se nas células basais e parabasais, onde o DNA do HPV é duplicado até atingir a média de 50 cópias por célula, sendo expressos os genes E do HPV. A replicação do DNA do HPV é sincrônica com o ciclo celular do hospedeiro, ocorrendo apenas durante a fase S. Durante ambos os estágios, o DNA do HPV é mantido como estruturas epissomais nos núcleos das células infectadas. Ao se dividirem, essas células infectadas distribuem equitativamente o DNA viral entre as células filhas. Parte dessas migra para a camada superior e inicia o programa de diferenciação celular, enquanto as demais continuam dividindo-se na camada basal e servem de reservatório de DNA viral para as posteriores divisões celulares. A replicação viral (**Figura 1.3**), deste modo, ocorre apenas em epitélios com diferenciação terminal e inclui tanto um aumento no número de cópias do genoma como a expressão dos genes tardios e formação de novos vírus. A produção de vírions é restrita às células epiteliais suprabasais maduras, onde todos os genes do vírus são expressos, permitindo a multiplicação do genoma viral, síntese de proteínas dos genes E e L, montagem e liberação dos vírions nas células epiteliais superficiais esfoliadas. Os HPV possuem capsídeo icosaédrico e replicam seus genomas dentro do núcleo das células do hospedeiro, sendo, portanto, partículas intranucleares obrigatórias, com tropismo específico para os ceratinócitos (WOODMAN *et al.*, 2007).

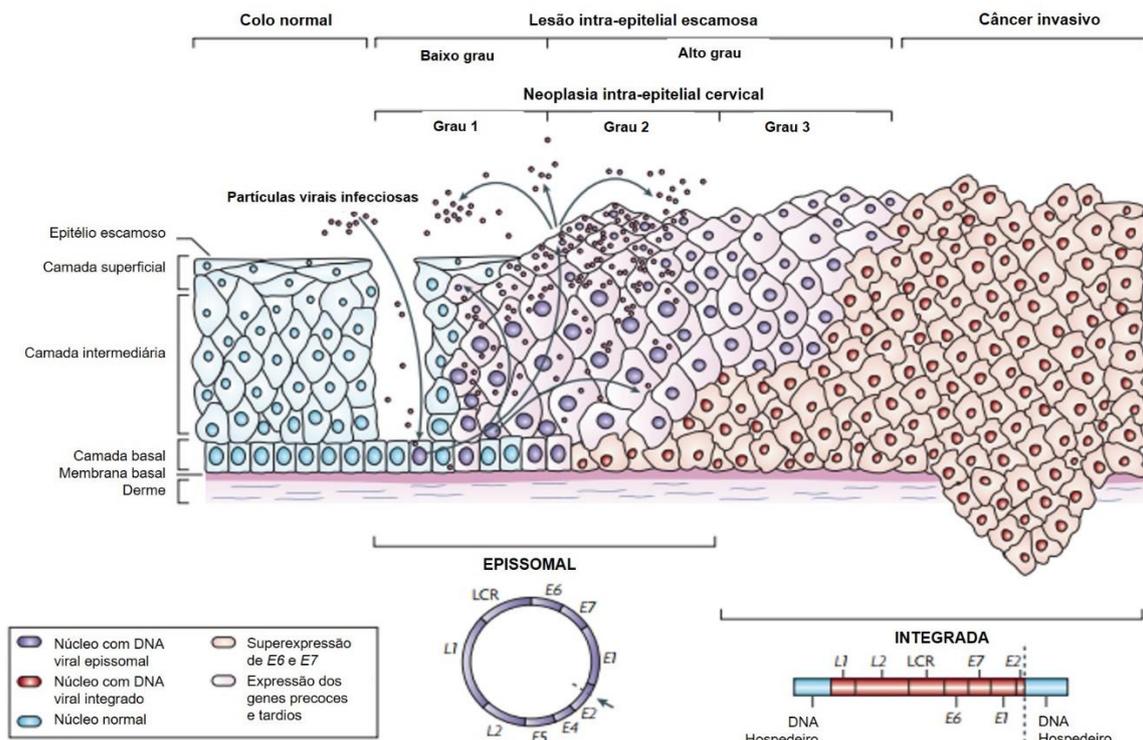


Figura 1.3: *Progressão mediada pelo HPV para câncer do colo de útero.* Infecção por HPV e integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira. Adaptado de WOODMAN *et al.*, 2007.

A base da sobrevivência dos HPV está em interferir no ciclo celular das células do hospedeiro, disponibilizando o maquinário celular para a replicação viral, através do estímulo à proliferação e diferenciação das células hospedeiras, associado à indução do sistema de síntese proteica para a produção de proteínas virais. Deste modo, quando o vírus infecta uma célula epitelial mitoticamente ativa, pode resultar em uma infecção latente, produtiva ou transformante. Na latência, há persistência do DNA circular, com um baixo número de cópias episomais que duplicam em sincronia com as células basais. A infecção produtiva, com indução de lesões clínicas ou subclínicas, pode ser detectada através das alterações morfológicas causadas quando a replicação viral resulta na formação de milhões de vírions e os ceratinócitos assumem novo fenótipo (coilocito). O tempo entre o início da infecção produtiva e a liberação dos vírions é de aproximadamente três semanas, tempo necessário para o ceratinócito basal sofrer diferenciação completa e descamação. Assim essas células sofrem esfoliação e podem causar infecção

em um novo hospedeiro. Já na infecção transformadora, não há formação de partículas virais infectantes, e o DNA viral integra-se ao genoma do hospedeiro e, quando interfere na homeostase do ceratinócito, pode transformá-lo e causar alterações morfológicas e/ou funcionais progressivas, que atingem o máximo de dano quando há o estabelecimento do carcinoma. A infecção de ceratinócitos pelo HPV depende de três fatores: da permissividade celular, do tipo do HPV e do estado imune do hospedeiro (FELLER *et al.*, 2009; SOUZA & GONÇALVES, 2009). O sistema imune é importante no controle da infecção por HPV. Existe evidência do envolvimento de células T *helper* em lesões em regressão, onde uma detectável resposta humoral e resposta celular imune contra antígenos do HPV são observadas durante a regressão da lesão (ZUR HAUSEN, 2002).

Em contrapartida, na orofaringe após a transmissão sexual, o HPV infecta o epitélio naturalmente descontínuo da orofaringe, também suscetível ao trauma mecânico, onde as células basais infectadas se diferenciam para preencher a área interrompida, resultando em infecção ativa do HPV (BERMAN & SCHILLER, 2017). Em comparação, nenhuma lesão precursora de CCEO foi definitivamente identificada. Em vez disso, em CCEO HPV positivo a imunohistoquímica (IHQ) de p16 é atualmente usada como biomarcador para HPV. Os algoritmos de diagnóstico atuais defendem a investigação por IHQ para p16 seguido por detecção de DNA de HPV, usando qualquer reação em cadeia da polimerase (PCR) por consenso ou hibridação *in situ* (ISH) (EVANS *et al.*, 2013).

Tipos específicos de HPV de alto risco irão infectar as superfícies mucosas. No colo do útero, a displasia severa induzida por HPV ocorre preferencialmente na zona de transformação: um pequeno anel de tecido na abertura do colo de útero, onde o epitélio escamoso estratificado do ectocervice transita para o epitélio colunar simples do endocervice (ROBERTS *et al.*, 2011). Na boca, o HPV induz preferencialmente câncer na orofaringe por razões desconhecidas. No entanto, as possíveis explicações podem incluir: 1) a orofaringe possui apenas mucosa de transição, semelhante ao colo do útero, com células epiteliais basais metaplásicas facilmente acessíveis (ELREFAEY *et al.*, 2014); 2) o epitélio da orofaringe é naturalmente atenuado por uma

membrana basal descontínua, permitindo uma maior susceptibilidade à infecção por HPV (CHI *et al.*, 2015); 3) as invaginações profundas das criptas amigdalinas podem funcionar como um reservatório para HPV (ELREFAEY *et al.*, 2014); e 4) as criptas do tecido linfático podem favorecer a infecção persistente do HPV, permitindo que os tumores evadam a vigilância imunológica com a sua forte expressão linfoepitelial do PD-L1 (*Programmed death-ligand 1*) para suprimir as respostas das células T ao HPV (EVANS *et al.*, 2013) (**Figura 1.4**).

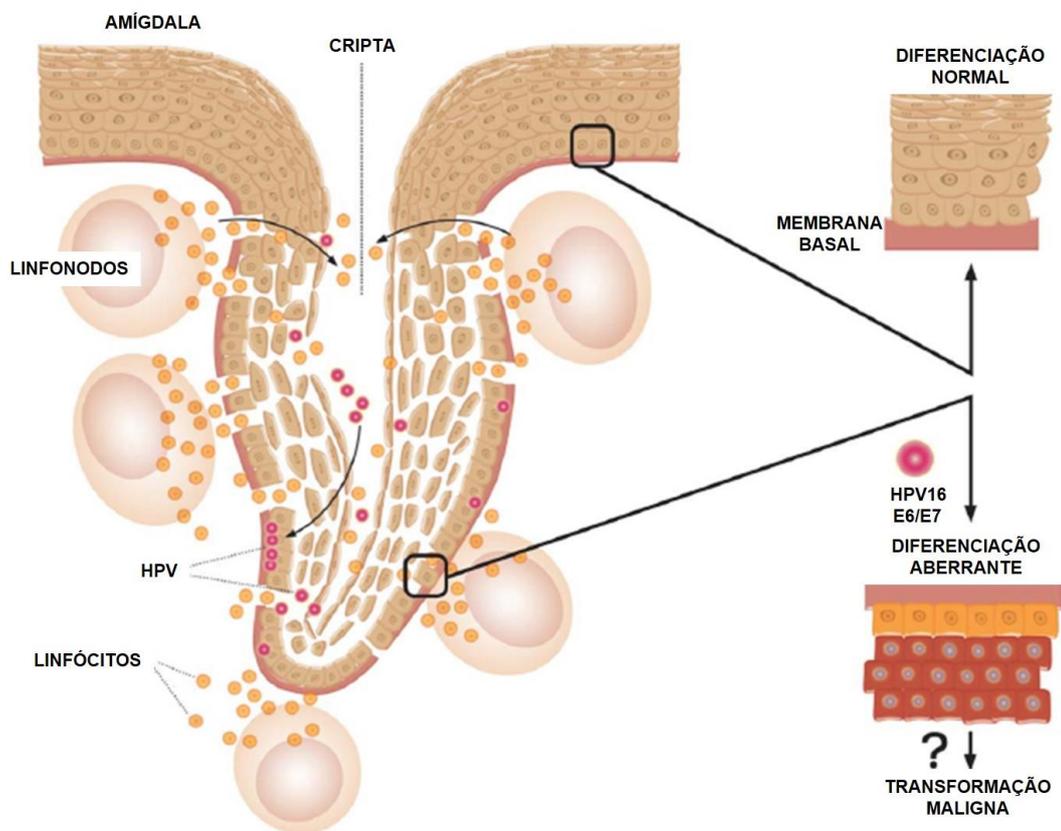


Figura 1.4: O HPV na carcinogênese da orofaringe é ilustrado. A patologia molecular do câncer da orofaringe associado ao HPV permanece incerta. Os tumores de cabeça e pescoço positivos para o HPV, que expressam *E6* e *E7*, têm uma predileção pelo o epitélio de cripta reticular de amígdalas palatinas e linguais. As descontinuidades na camada epitelial, expondo a membrana basal, podem facilitar a entrada viral, enquanto o tecido linfóide próximo pode influenciar a carcinogênese do HPV com aumento da liberação de citocinas. As lesões potencialmente malignas não foram inequivocamente identificadas na

orofaringe, em contraste com o tecido do colo uterino, talvez relacionadas à dificuldade de amostragem das criptas amigdalíneas profundas. Grande parte do HPV detectado no CCEO é epissomal, embora o DNA do HPV integrado tenha sido detectado no epitélio da cripta de amígdalas. Adaptado de BERMAN & SCHILLER, 2017.

1.3 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE

Nos Estados Unidos, com base em dados do Programa *SEER*, os pesquisadores estimaram que de 1988 a 2004, a incidência de câncer de orofaringe HPV positivo aumentou em 225% (0,8 a 2,6 por 100.000 habitantes) e a incidência de CCEO HPV negativo diminuiu em 50% (CHATURVEDI *et al.*, 2011; GILLISON *et al.*, 2015). Nos Estados Unidos, o CCEO HPV positivo já superou o número anual de câncer de colo do útero HPV positivo. Esta mudança epidemiológica é resultado do aumento da prática de sexo oral e declínio no consumo de tabaco (BERMAN & SCHILLER, 2017). Aumento significativo na incidência do câncer de orofaringe HPV positivo também foi relatado na Suécia, Austrália, Canadá e outros países. Cerca de 70% a 80% dos CCEO agora são atribuídos ao HPV nos Estados Unidos e na Europa Ocidental, com proporções substancialmente menores de CCEO HPV positivo relatados em outras regiões (O'SULLIVAN *et al.*, 2016).

No Brasil, cerca de 27,4% (4-30%) dos CCEO são HPV positivos. Essa taxa varia de acordo com o sítio da orofaringe acometido e com as técnicas empregadas para detecção viral (RIBEIRO *et al.*, 2011; KAMINAGAKURA *et al.*, 2012; LÓPEZ *et al.*, 2014; HAUCK *et al.*, 2015; MATOS *et al.*, 2015; BETIOL *et al.*, 2016; PIÑA *et al.*, 2016).

Aproximadamente 85.000 casos de CCEO são diagnosticados por ano para ambos os sexos em todo o mundo, com cerca de 22.000 CCEO positivos para HPV e uma proporção entre homens e mulheres de 4:1 (FORMAN *et al.*, 2012). A predominância masculina, embora não seja totalmente compreendida, pode ser, em grande parte, devido a uma maior prevalência de infecções orais por HPV 16 em homens do que em mulheres (GILLISON *et al.*, 2012). Além

disso, a transmissibilidade oral do HPV pode ser maior entre homens que praticam sexo oral em mulheres, possivelmente devido à presença de um maior número de cópias de HPV na vagina (D'SOUZA & DEMPSEY, 2011).

Vale ressaltar que existe um predomínio semelhante entre homens e mulheres com CCECP não relacionado ao HPV, embora isso possa refletir a prevalência do fumo mundial de 5:1 entre homens e mulheres (DAYYANI *et al.*, 2010). No entanto, nos países de alta renda, as mulheres fumam quase na mesma proporção que os homens; e, em todo o mundo, o etilismo é quase equivalente em ambos os sexos (HITCHMAN & FONG, 2011; SLADE *et al.*, 2016). Aqui, a disparidade de prevalência do CCEO HPV negativo é mal compreendida, porque os fatores de risco se aplicam igualmente para os sexos em países afluentes (BERMAN & SCHILLER, 2017).

Os países em desenvolvimento têm uma proporção relativamente baixa de CCEO (1-10% dos CCECPs), que parece permanecer estável (ou até menor) ao longo do tempo, enquanto a incidência do CCECP tem aumentado de forma constante na maioria dos países (MCKEAN-COWDIN *et al.*, 2000; VAN MONSJOU *et al.*, 2010).

Já os países desenvolvidos apresentam uma proporção relativamente alta e variável de CCEO (15-30% dos CCECPs). Por exemplo, o cinturão central de países europeus tem as maiores proporções de CCEO do mundo desenvolvido (até 30% dos CCECPs), sendo o restante da Europa caracterizado por proporções ligeiramente menores de CCEO, enquanto a incidência global do CCECP se manteve estável ou mesmo mostrou uma tendência decrescente durante o mesmo período (ROBINSON & MACFARLANE, 2003; HAMMARSTEDT *et al.*, 2007; VAN MONSJOU *et al.*, 2010). Estes dados demográficos levaram os pesquisadores a procurar fatores de risco adicionais que contribuíssem para a incidência do CCEO.

1.3.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS, HPV NEGATIVO

O CCEO HPV negativo é um subconjunto de CCEO que não tem associação com HPV de alto risco, também conhecido como carcinoma de

células escamosas ceratinizantes. Os pacientes com CCEO negativo para HPV são mais velhos em média do que os pacientes com CCEO relacionado com HPV (VAN MONSJOU *et al.*, 2015) (**Tabela 1.3**).

Fumar é de longe o fator de risco mais relevante para o câncer de boca e de orofaringe. Existe um aumento de risco dependente da dose, e o risco diminui após a cessação do uso do tabaco (IARC, 2004; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2010). O consumo de álcool interage sinergicamente com o tabagismo, caracterizando um risco adicional (GOLDSTEIN *et al.*, 2010; IARC, 2010; BAGNARDI *et al.*, 2015). O HPV, em particular o tipo 16, é um fator etiológico reconhecido no CCEO, mas só é observado em uma pequena minoria (3%) dos CCEO (DAHLGREN *et al.*, 2004; LINGEN *et al.*, 2013; GILLISON *et al.*, 2015; SGARAMELLA *et al.*, 2015). A má saúde bucal está associada ao câncer de boca e de orofaringe (GUHA *et al.*, 2007; DIVARIS *et al.*, 2010), mas não foi comprovada como um fator de risco independente (WARNAKULASURIYA, 2009). Uma dieta rica em frutas e legumes parece ter algum efeito protetor contra o câncer de boca e de orofaringe (BRAVI *et al.*, 2013; MAASLAND *et al.*, 2015).

Considerando que a maioria dos exemplos de CCEO HPV negativo envolve o palato mole, os pacientes tipicamente apresentam dor de garganta e dificuldade em engolir ou apresentam uma massa no pescoço (COSKUN *et al.*, 2011). Macroscopicamente, os CCE são tumores infiltrativos firmes, com uma superfície de corte branca ou parda. Citopatologicamente, os esfregaços de lesões metastáticas geralmente apresentam características de CCE ceratinizantes, com pequenos aglomerados de células escamosas malignas com ceratinização intracelular e extracelular. Casos pontuais têm características citológicas idênticas às dos tumores HPV positivos (isto é, CCE não ceratinizante) (EL-MOFTY *et al.*, 2008; BOSCOLO-RIZZO *et al.*, 2015).

Histopatologicamente, o CCEO negativo para HPV apresenta tipicamente características escamosas diferenciadas (por exemplo: ceratinização, reação estromal desmoplásica e displasia superficial) idênticas às dos CCE em outros locais da mucosa da cabeça e pescoço (LEWIS *et al.*, 2012). O *status* do HPV é negativo (por imuno-histoquímica para p16 e/ou detecção molecular do HPV). A classificação histopatológica é semelhante à

utilizada para CCE em outros locais de cabeça e pescoço (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

A maioria dos CCEO é geneticamente instável, com perda cromossômica em 3p, 8p, 9p, 17p e ganhos a 3q e 11q (BHATTACHARYA *et al.*, 2011; SANTOS-SILVA *et al.*, 2011; PICKERING *et al.*, 2013). Essas alterações podem se estender pela região ao redor da lesão clínica, sustentando o fenômeno clínico da cancerização de campo (BRAAKHUIS *et al.*, 2003). Os genes reportados como tendo um papel no CCEO (por exemplo: *TP53*, *CDKN2A*, *PTEN*, *HRAS* e *PIK3CA*) são mutados com frequência suficiente para suportar o seu potencial papel como *drivers* no desenvolvimento do câncer. O gene *TP53* é normalmente mutado (STRANSKY *et al.*, 2011; LUI *et al.*, 2013; PICKERING *et al.*, 2013; LAWRENCE *et al.*, 2015). A taxa de sobrevida global em três anos dos CCEO negativos para HPV é de 57% (EL-NAGGAR *et al.*, 2017) (**Tabela 1.3**).

1.3.2 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS, HPV POSITIVO

O CCEO associado ao HPV de alto risco é uma forma epidemiológica, clínico e patológica distinta de CCECP, também conhecido como carcinoma de células escamosas não ceratinizante. A incidência de CCEO HPV positivo aumentou ao longo das últimas três décadas (CHATURVEDI *et al.*, 2011; CHATURVEDI *et al.*, 2013; RETTIG & D'SOUZA, 2015). Pacientes com CCEO positivo para HPV são tipicamente homens, brancos e com alto nível socioeconômico (GILLISON *et al.*, 2008; CHATURVEDI *et al.*, 2011). A idade mediana dos pacientes é de 50-56 anos (GILLISON *et al.*, 2008; ANG *et al.*, 2010), com uma proporção entre homem e mulher de 4:1 (**Tabela 1.3**).

O CCEO HPV positivo é causado pelo HPV de alto risco, sendo o tipo 16 responsável por mais de 90% dos casos (SCHWARTZ *et al.*, 1998; D'SOUZA *et al.*, 2007; GILLISON *et al.*, 2008). O sexo oral é um fator de risco estabelecido para a infecção oral pelo HPV. Indivíduos com CCEO positivos para HPV são menos propensos a ser fumante do que pacientes com CCEO negativos para HPV. No entanto, o tabagismo está associado a uma

prevalência significativamente maior de HPV oral e, portanto, pode desempenhar algum papel na progressão da infecção oral pelo HPV nos casos de CCEO HPV positivo (FAKHRY *et al.*, 2014).

CCEO HPV positivo tem uma forte predileção pela localização em base da língua e nas amígdalas (BEGUM *et al.*, 2005). Ao contrário do CCEO HPV negativo, o CCEO HPV positivo apresenta-se tipicamente em estadiamento clínico avançado, frequentemente com tumor primário pequeno com envolvimento linfonodal. A linfadenopatia cervical, que pode ser cística, é a apresentação clínica mais comum. Os tumores primários podem ser grandes, mas em sua maioria são pequenos e apresentam discretas alterações a inspeção. As metástases linfonodais são frequentemente grandes e císticas (GOLDENBERG *et al.*, 2008; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Citopatologicamente, os esfregaços de lesões metastáticas são celulares, com células tumorais formando folhas e aglomerados coesos, com núcleos hipercromáticos, pleomórficos e sobrepostos. A presença de diferenciação escamosa e ceratinização é incomum. A presença de p16 ou HPV em células tumorais sugere fortemente um tumor primário de orofaringe (JARBOE *et al.*, 2012).

Histopatologicamente, o CCEO HPV positivo geralmente exibe uma morfologia distinta não ceratinizante; ao contrário de casos HPV negativo, a displasia do epitélio superficial é raramente identificada. CCEO HPV positivo surgem do epitélio da cripta e crescem sob o revestimento epitelial superficial como ninhos e lóbulos, muitas vezes com necrose central. Os ninhos de tumores são frequentemente incorporados ao estroma linfóide e podem ser penetrados pelas células linfóides. As células tumorais apresentam uma elevada relação N:C (núcleo/citoplasma) e uma taxa mitótica e/ou apoptótica elevada, que muitas vezes gera uma aparência basalóide (WESTRA, 2015). A ceratinização está ausente ou discreta na maioria dos casos, embora um pequeno subconjunto de casos mostre a formação de ceratina (GILLISON *et al.*, 2000; CHERNOCK *et al.*, 2009).

As oncoproteínas E6 e E7 do HPV inativam p53 e pRb direcionando-os para a degradação de proteínas. As mutações somáticas no *TRAF3*, um regulador imune, são exclusivas do CCEO HPV positivo. A mutação oncogênica ou amplificação gênica de *PIK3CA* é significativamente mais

comum em CCEO HPV positivo do que em CCEO HPV negativo (PARFENOV *et al.*, 2014; LAWRENCE *et al.*, 2015). CCEO HPV positivo apresenta uma sobrevida significativamente melhor do que o CCEO negativo para HPV (FAKHRY *et al.*, 2008; ANG *et al.*, 2010; POSNER *et al.*, 2011), mas este prognóstico favorável pode ser atenuado pelos efeitos adversos do tabagismo (ANG *et al.*, 2010; GILLISON *et al.*, 2012). O risco de recidiva e do desenvolvimento de segundos tumores primários é mais baixo nos CCEO positivos para o HPV do que nos casos negativos para o HPV (ANG *et al.*, 2010) (**Tabela 1.3**).

Tabela 1.3: Comparação de CCEO HPV positivo e HPV negativo.

Características	CCEO HPV positivo	CCEO HPV negativo
<i>Idade Média</i>	50-56 anos	60-70 anos
<i>Fatores de risco</i>	Comportamento sexual	Uso de álcool e tabaco
<i>Metástase linfonodal</i>	Frequentemente cística	Cistos pouco frequentes
<i>Origem postulada</i>	Epitélio reticulado de criptas invaginadas	Epitélio de superfície
<i>Displasia</i>	Raro	Frequentemente presente
<i>Morfologia</i>	Comumente CCE não ceratinizante	CCE convencional
<i>Gradação</i>	Não aplicável	Aplicável
<i>p16 imunexpressão</i>	Positivo	Negativo
<i>Taxa de sobrevivência global (3 anos)</i>	82%	57%

Fonte: Adaptado de EL-NAGGAR *et al.*, 2017.

1.3.3 SISTEMA DE ESTADIAMENTO TNM PARA O CCEO

O estadiamento clínico TNM tem como objetivo delinear a extensão anatômica da doença através da combinação de seus componentes: T - extensão local ou tamanho do tumor primário; N - disseminação regional para linfonodos; M - presença ou ausência de metástase a distância. Após definir as categorias T, N e M, elas podem ser agrupadas em estádios. O carcinoma *in*

situ insere-se no estágio 0 e casos com metástase a distância, no estágio IV (COSTA *et al.*, 2002; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

O sistema de estadiamento TNM reúne uma classificação clínica e uma histopatológica. A classificação clínica pré-tratamento, designada cTNM, baseia-se nas evidências observadas antes do tratamento, durante o exame físico, por imagem, endoscopia e biópsia. A classificação patológica, ou classificação histopatológica pós-cirúrgica, denominada pTNM, fundamenta-se também nas informações conseguidas antes do tratamento, mas é suplementada ou modificada pela evidência adicional conseguida através da cirurgia e do exame histopatológico. A avaliação histopatológica do tumor primário (pT) exige a ressecção do tumor, ou biópsia adequada, para avaliar a maior categoria pT. A avaliação microscópica dos linfonodos regionais (pN) exige a remoção representativa de nódulos, a fim comprovar ausência de metástase em linfonodos regionais (pN0) e suficiente para avaliar a maior categoria pN. A investigação microscópica também se torna necessária para análise de metástases à distância (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

A classificação TNM tem sido usada para estimar clinicamente a resposta à terapia e a sobrevida (BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005). BRYNE *et al.* (1998) sugere que fatores prognósticos suplementares deveriam ser adicionados à classificação TNM dos CCECP para auxiliar o diagnóstico clínico (BRYNE *et al.*, 1998). A localização anatômica da lesão também deve ser considerada como uma indicadora de prognóstico, já que os tumores apresentam comportamentos diferentes, dependendo da localização anatômica (COSTA *et al.*, 2002).

O aumento meteórico da incidência de câncer de orofaringe associado ao HPV de alto risco na base de língua e amígdala gerou inúmeros desafios para seu diagnóstico, estratégia de tratamento e expectativa de resposta (MEHANNA *et al.*, 2010). Devido ao seu comportamento biológico exclusivo, o estabelecimento de critérios de estadiamento e do sistema de estadiamento reportados pela União Internacional de Combate ao Câncer (UICC) na 7ª edição do Manual de Estadiamento do Câncer em 2009 são considerados inadequados para definir com precisão a história natural desta doença (STRAETMANS *et al.*, 2009).

As principais mudanças na 8ª edição do TNM para o câncer de cabeça e pescoço refletem o ambiente em mudança da oncologia da cabeça e pescoço. O capítulo da Faringe foi dividido em três regiões anatômicas distintas que refletem melhor as diferentes doenças que surgem na faringe: 1) nasofaringe tem seu próprio capítulo, reconhecendo a biologia e a etiologia únicas desta doença; 2) a orofaringe e a hipofaringe HPV-negativas permanecem juntas em vista de sua biologia compartilhada e fatores de risco típicos; e 3) foi adicionado um novo capítulo, em que é descrito o câncer de orofaringe associado ao HPV (AJCC, 2017).

Um sistema de estadiamento que reconhece a crescente incidência de tumores relacionados ao HPV da orofaringe é necessário para uma melhor discriminação entre os estadiamentos (AJCC, 2017). A imuno-histoquímica para a superexpressão de p16 emergiu como um biomarcador substituto robusto para carcinogênese mediada por HPV de alto risco (EL-NAGGAR & WESTRA, 2012).

Todos os CCEO devem ser testados para p16. Aqueles que não superexpressam p16, ou nos quais o teste p16 não foi realizado, serão classificados seguindo a categoria CCEO p16 negativo. Já o grupo que superexpressa p16 será classificado na categoria CCEO p16 positivo. As categorias T permanecerão as mesmas para o CCEO p16 positivo e p16 negativo, exceto que a classificação p16 positivo não incluirá a categoria Tis, e não haverá T4b dentro de T4 (AJCC, 2017) (**Tabela 1.4**).

Tabela 1.4: Estadiamento clínico do CCEO de acordo com o status de p16.

Categoria	CCEO p16 positivo	CCEO p16 negativo
<i>Tumor primário (cT)</i>	T0: não identificado primariamente	Tx: tumor primário não pode ser avaliado
	T1: tumor de ≤2cm na maior dimensão	Tis: Carcinoma <i>in situ</i>
	T2: tumor >2cm e <4cm na maior dimensão	T1: tumor de ≤2cm na maior dimensão
	T3: tumor ≥4cm na maior dimensão ou se estende na superfície lingual da epiglote	T2: tumor >2cm e <4cm na maior dimensão
	T4: doença local moderadamente avançada, tumor invade laringe, músculo extrínseco da língua, pterigoide medial,	T3: tumor ≥4cm na maior dimensão ou se estende na superfície lingual da epiglote
		T4: <u>T4a</u> doença local moderadamente avançada; tumor invade a laringe, músculo extrínseco da

	palato duro, ou mandíbula	língua, pterigoide medial, palato duro ou mandíbula; T4b doença local muito avançada; tumor invade o músculo pterigoideo lateral, lateral da nasofaringe ou base do crânio ou artéria carótida
<i>Linfonodos regionais (cN)</i>	Nx: não podem ser avaliados ou não há metástase em linfonodo regional N1: 1 ou mais linfonodos ipsilaterais, <6cm N2: linfonodos contralaterais ou bilaterais, <6cm N3: Linfonodo(s) >6cm	Nx: não podem ser avaliados N0: não há metástase em linfonodo regional N1: 1 linfonodo ipsilateral, ≤3cm e ENE- N2: N2a 1 linfonodo ipsilateral >3cm e <6cm e ENE-; N2b múltiplos linfonodos ipsilaterais, <6cm e ENE-; N2c linfonodos bilaterais ou contralaterais, <6cm e ENE- N3: N3a 1 linfonodo >6cm e ENE-; N3b metástase em qualquer linfonodo(s) e ENE+
<i>Metástase a distância (cM)</i>	M0: nenhuma metástase M1: presença de metástase a distância	M0: nenhuma metástase M1: presença de metástase a distância
<i>Estadiamento clínico (cTNM)</i>	I: T0/T1/T2; N0/N1; M0 II: T0/T1/T2; N2; M0 ou T3; N0/N1/N2; M0 III: qualquer T; N3; M0 ou T4; qualquer N; M0 IV: qualquer T; qualquer N; M1	0: Tis; N0; M0 0 I: T1; N0; M0 II: T2; N0; M0 III: T3; N0; M0 ou T1/T2/T3; N1; M0 IVA: T4a; N0/N1; M1 ou T1/T2/T3/T4a; N2; M0 IVB: qualquer T; N3; M0 ou T4b; qualquer N; M0 IVC: qualquer T; qualquer N; M1

Abreviação: Extensão extranodal, ENE.

Fonte: Adaptado de AJCC, 2017.

A detecção direta do HPV não é usada como um fator determinante na classificação, por sua limitação em relação à disponibilidade universal e aplicabilidade, custo e falha na estratificação da sobrevida, bem como na imunoeexpressão da proteína p16 (AJCC, 2017).

1.3.4 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO DO CCEO

O CCEO é frequentemente diagnosticado quando já é sintomático e, portanto, em estadiamentos avançados. O tratamento para o CCEO é o mesmo, independentemente do *status* de HPV ou da positividade para p16,

apesar dos melhores resultados nos pacientes CCEO HPV positivos. Pacientes com estadiamento inicial podem ser tratados com cirurgia primária e/ou radioterapia exclusiva (EVANS *et al.*, 2013). No entanto, pacientes com CCEO frequentemente apresentam doença em estágio avançado que necessita de tratamento multimodal, incluindo a quimiorradioterapia ou cirurgia com cisplatina concorrente, geralmente mórbida, seguida de radioterapia adjuvante com ou sem quimioterapia. Atualmente, muitos estudos estão em andamento para descalonar a terapia para CCEO associado ao HPV, devido ao seu melhor prognóstico, o que levará a uma menor toxicidade, sendo importante para essa população mais nova, que possui uma expectativa de vida (VOKES *et al.*, 2015; WIRTH, 2016). A decisão sobre o tipo de tratamento para os pacientes com CCEO deve levar em consideração a clínica, o exame histopatológico e fatores específicos do paciente (FURLAN *et al.*, 2017).

Existe um risco reduzido de morte de 28% e um risco reduzido de recidiva 49% para pacientes com CCEO HPV positivo *versus* aqueles com CCEO HPV negativo (ELREFAEY *et al.*, 2014). As principais diferenças biológicas podem explicar porque o CCEO relacionado ao HPV responde melhor ao tratamento do que o CCEO HPV negativo: 1) nos cânceres causados pelo HPV, o vírus silencia o p53, mas deixa o gene que o produz intacto, em contraste, nos cânceres negativos para o HPV, o gene é mutado, provavelmente através da exposição a substâncias carcinogênicas, como tabaco e/ou álcool, e produz uma versão ineficaz da proteína. A quimioterapia ou a radioterapia podem, de algum modo, reativar p53 nos cânceres positivos para o HPV, transformando a poderosa proteína para lutar contra o tumor (SCUDELLARI, 2013). Numerosos estudos relataram uma correlação inversa entre DNA do HPV e mutações de p53 (GILLISON *et al.*, 2000); 2) pacientes com câncer HPV positivo geralmente são mais jovens e saudáveis do que sua contraparte HPV negativa, com melhor *performance status*, sem histórico de tabagismo e menos co-morbidades (ELREFAEY *et al.*, 2014); 3) existe maior heterogeneidade genética em tumores HPV negativos do que nos tumores HPV positivos, incluindo uma maior amplitude de mutações somáticas (SCUDELLARI, 2013). Um tumor negativo para HPV pode apresentar uma maior probabilidade de mutação que gere resistência à terapia; 4) a

persistência da infecção pelo HPV nas amígdalas pode promover uma resposta imune anti-tumoral a antígenos de tumores específicos de vírus após a quimioterapia ou radioterapia (ELREFAEY *et al.*, 2014); 5) os tumores HPV positivos apresentam maior radiosensibilidade, talvez por apresentar uma resposta apoptótica intacta após radioterapia (ELREFAEY *et al.*, 2014); 6) o CCEO HPV positivo pode ser detectado anteriormente, pois 51% dos pacientes apresentam inicialmente uma massa no pescoço *versus* 18% dos pacientes com CCEO HPV negativo, que é menos propenso a metástase para os linfonodos cervicais (MOORE & MEHTA, 2015); 7) o CCEO negativo para o HPV demonstra maior progressão loco-regional do que o CCEO positivo para HPV, tornando o CCEO HPV negativo mais resistente ao tratamento (MISIUKIEWICZ *et al.*, 2014).

Embora a positividade do HPV represente um forte fator de prognóstico tanto para uma melhor sobrevida quanto para um risco reduzido de recidiva, existe um subconjunto de pacientes com CCEO HPV positivo que ainda apresenta resultados ruins (ANG *et al.*, 2010). Além disso, os pacientes com CCEO negativos para o HPV, têm um risco ainda maior de recidiva apesar do tratamento intensivo, ainda faltam biomarcadores prognósticos adequados para a previsão de resultados clínicos (FURLAN *et al.*, 2017).

1.3.5 DETECÇÃO DO HPV

Para o diagnóstico do HPV na orofaringe são utilizados diversos métodos. O HPV pode ser detectado por ensaios moleculares (por exemplo, hibridização *in situ* e ensaios baseados em PCR) realizados individualmente ou em combinação HPV (WESTRA, 2014). A imunexpressão difusa para p16 é um marcador substituto confiável para a presença de HPV de alto risco em CCEO e pode ser suficiente como um teste autônomo para o *status* de HPV em tumores com morfologia não ceratinizante apropriada HPV (LEWIS, 2012). A possibilidade de perda da expressão de p16 também deve ser considerada, especialmente em pacientes com fatores de risco tradicionais (consumo de tabaco e álcool), e testes adicionais para detecção do vírus de alto risco devem

ser realizados. O teste de HPV positivo também pode apontar a orofaringe como o sítio primário mais provável para a metástase do linfonodo cervical de casos com tumor primário oculto HPV (BEGUM *et al.*, 2003) (**Figura 1.5**).

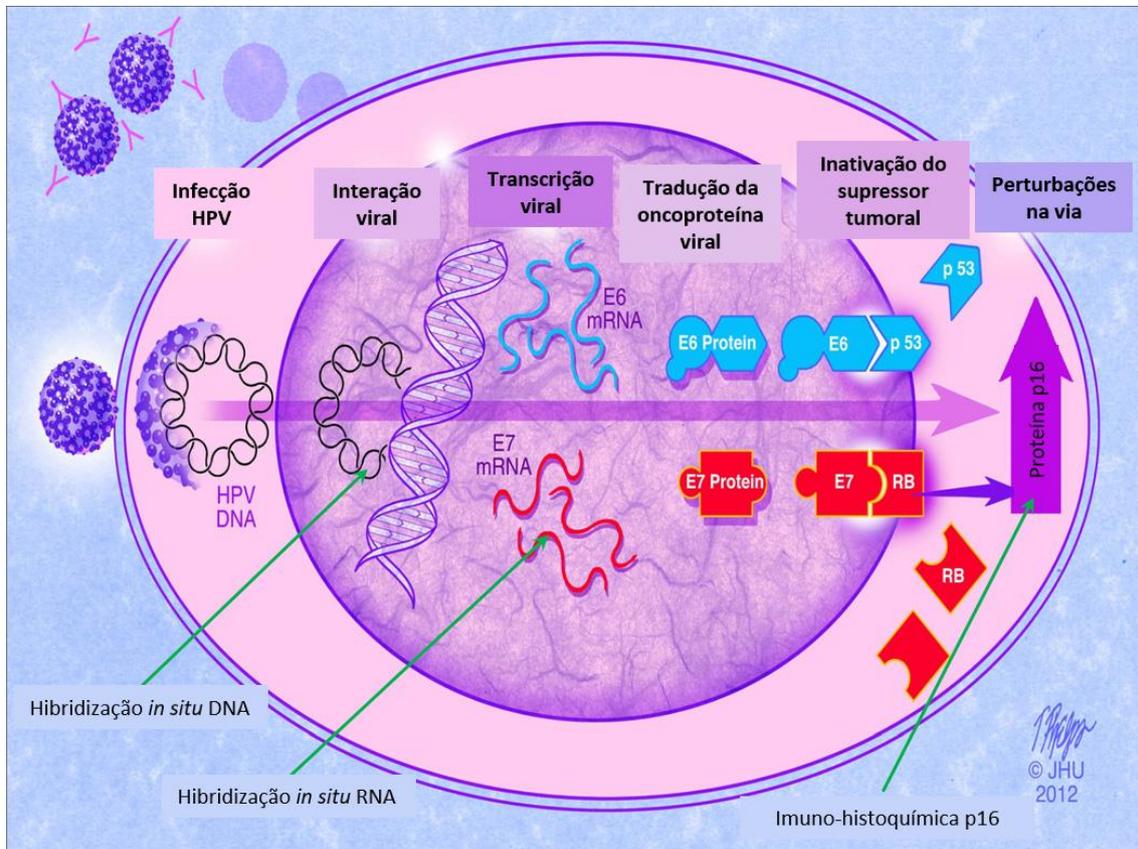


Figura 1.5: Via patogénica do HPV no CCEO. O DNA viral é integrado no DNA do hospedeiro. A transcrição do RNAm de E6 e E7 do HPV conduz à inativação das proteínas p53 e pRb e, indiretamente, ao acúmulo de p16. Os métodos atuais podem detectar o HPV ao nível do DNA (hibridização *in situ* ou PCR), RNAm (hibridização *in situ* ou RT-PCR) e proteína (imuno-histoquímica p16 como marcador substituto). Adaptado de BISHOP *et al.*, 2012.

Quando o teste de p16 ou HPV não está disponível, o CCEO pode ser diagnosticado como "carcinoma de células escamosas, *status* de HPV desconhecido" ou, se o tumor apresentar a morfologia característica não ceratinizante, como "carcinoma de células escamosas, HPV não testado,

morfologia altamente sugestiva de associação com HPV" (EL-NAGGAR *et al.*, 2017) (Figura 1.6).

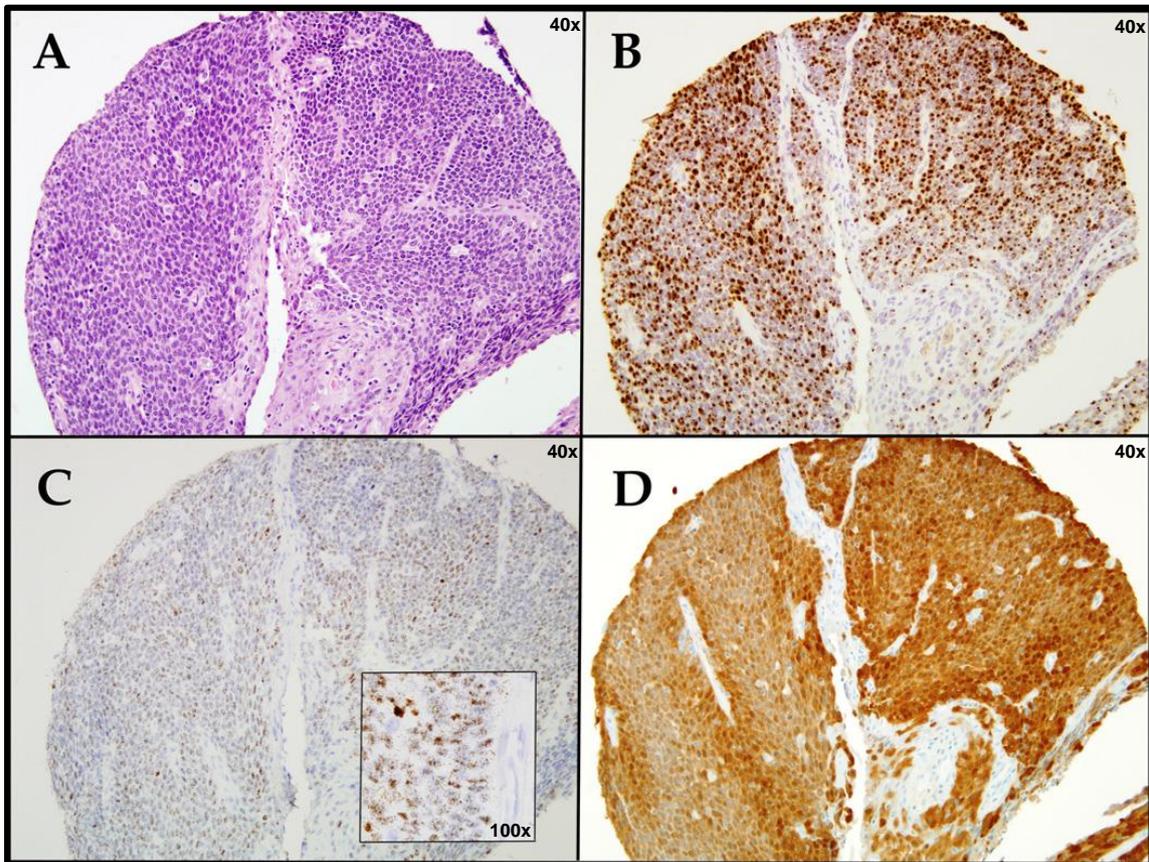


Figura 1.6: CCEO associado ao HPV. **A** CCE não ceratinizantes de orofaringe (HE). **B** Hibridação *in situ* de HPV estabelece a presença do vírus. **C** Hibridação *in situ* de RNAm de HPV confirma a ativação transcricional do RNAm *E6 / E7*. **D** Superexpressão do inibidor de quinase dependente de ciclina p16 indica interrupção da via do supressor de tumor de retinoblastoma. Adaptado de BISHOP *et al.*, 2012.

1.3.6 PREVENÇÃO E RASTREAMENTO DO CCEO

Como as crescentes proporções de CCEO são atribuíveis à infecção por HPV, a prevenção primária com vacinação contra o HPV poderia efetivamente reduzir a incidência desses e outros cânceres associados ao HPV (DAYYANI *et al.*, 2010).

Duas vacinas profiláticas estão atualmente disponíveis e aprovadas pela ANVISA: *Cervarix* (GSK®), uma vacina bivalente destinada a prevenir infecções de HPV tipo 16 e 18, e *Gardasil* (Merck®), uma vacina quadrivalente destinada a subtipos de HPV 6, 11, 16 e 18. Existe uma terceira vacina, que ainda não foi aprovada no Brasil, a *Gardasil 9* (Merck®), uma vacina nonavalente visando os subtipos de HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. A adição de subtipos de HPV 31, 33, 45, 52 e 58 a *Gardasil 9* resulta numa vacina destinada aos subtipos de HPV que causam cerca de 90% dos cânceres do colo uterino em todo o mundo (JOURA *et al.*, 2015).

As vacinas aprovadas estão disponíveis para meninas e mulheres jovens para a prevenção do câncer vulvar, vaginal, do colo de útero e do canal anal, além das verrugas genitais. Já entre os meninos e homens jovens a prevenção visa as verrugas genitais e câncer do canal anal (BERMAN & SCHILLER, 2017).

Apenas um estudo, até o momento, relatou a eficácia da vacina do HPV contra a infecção oral. Nas jovens mulheres costarriquenhas, a vacina bivalente reduziu a prevalência de infecção oral por HPV 16 e 18 em 93,3% em comparação com o grupo controle, aproximadamente quatro anos após a vacinação (HERRERO *et al.*, 2013). Além disso, ao reduzir efetivamente a incidência e a transmissão do HPV anogenital, a vacina também deve reduzir indiretamente a incidência e a transmissão sexual do HPV oral e, assim, diminuir a incidência de CCEO positivo para o HPV. No entanto, considerando a latência longa (aproximadamente 30 anos) de exposição à doença, a incidência do CCEO positivo para HPV não começará a diminuir antes do ano 2060 (WIRTH, 2016).

Atualmente, nenhum programa efetivo de rastreio para CCEO existe porque não há lesões precursoras identificadas. Um teste ao "Pap-test" usando uma escova de citologia para coletar amostras de células da orofaringe só foi útil ao estudo que detectou CCEO invasivo na presença de lesões acessíveis e tinha utilidade limitada para populações sem lesões visíveis ou doença clínica (KREIMER & CHATURVEDI, 2011). Métodos de detecção de HPV estão disponíveis, como o teste do DNA salivar, mas a relação causal entre o DNA do

HPV detectado na orofaringe e o desenvolvimento subsequente do CCEO é mal compreendida (BERMAN & SCHILLER, 2017).

A avaliação e o diagnóstico de CCEO, como sempre, devem começar pela anamnese e exame clínico de cabeça e pescoço, prestando especial atenção aos sintomas de dor de garganta persistente, disfagia crônica, odinofagia e otalgia. O exame clínico deve incluir inspeção do complexo amigdaliano, inspeção e palpação da base de língua e avaliação cuidadosa dos linfonodos cervicais (MOORE & MEHTA, 2015). A IHQ para p16, a PCR e ISH para detectar o DNA do HPV representam os biomarcadores do HPV atualmente utilizados para testar os tecidos tumorais. Métodos alternativos para detecção do DNA de HPV estão em desenvolvimento, como monitoramento molecular e vigilância de mutações somáticas e/ou genes de HPV na saliva e no plasma para viabilizar assistência personalizada (VOKES *et al.*, 2015). A inclusão de novos biomarcadores para uma melhor abordagem de tratamento personalizado para o CCEO é urgentemente necessária (FURLAN *et al.*, 2017).

1.4 EPIGENÉTICA

A genética clássica sozinha não é capaz de explicar a diversidade de fenótipos dentro de uma população, tampouco explicar fenótipos distintos e susceptibilidades diferentes a doenças, em gêmeos homocigóticos ou em animais clonados (ESTELLER, 2008). O termo epigenética foi utilizado pela primeira vez por Conrad Waddington em 1939 para descrever “as interações causais entre os genes e seus produtos que permitem a expressão fenotípica” (STERN & CONRAD, 2000; LIMA, 2012). Atualmente o termo é utilizado para as modificações mitótica e/ou meioticamente herdáveis que resultam em alterações da expressão gênica e organização da cromatina, sem, no entanto, alterar a sequência de bases do DNA (WOLFFE & MATZKE, 1999; JAENISCH & BIRD, 2003; BOCK & LENGAUER, 2008).

A herança epigenética representa um mecanismo crítico que permite a propagação estável da atividade gênica ao longo de gerações celulares. É notável sua importância e, portanto, este campo de estudo tem recebido

bastante atenção, uma vez que processos epigenéticos são essenciais para o desenvolvimento e processos celulares, tais como transcrição gênica, diferenciação e proteção antiviral. Mecanismos epigenéticos são versáteis e adaptados a específicas funções celulares, não apenas durante o desenvolvimento do organismo, mas ao longo de toda sua vida. Consistente com a grande importância relacionada a estes mecanismos, a desregulação nestes está intimamente relacionada a doenças humanas, mais notavelmente o câncer (SAWAN *et al.*, 2008).

Existem três mecanismos epigenéticos principais que levam à regulação da expressão gênica que são: RNAs não codificantes, modificações de histonas e metilação do DNA, que é o mecanismo mais bem estudado dentre os três citados (HERCEG, 2007; SAWAN *et al.*, 2008) (**Figura 1.7**).

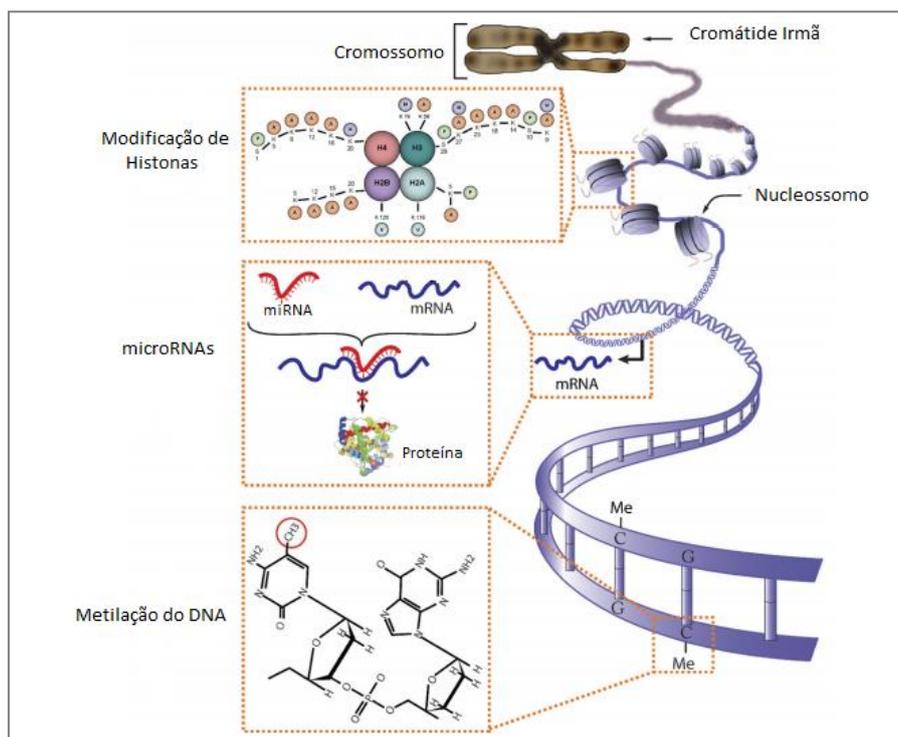


Figura 1.7: Mecanismos epigenéticos relacionados à regulação da expressão gênica. Modificações de histonas, silenciamento gênico mediado por RNAs e metilação do DNA constituem os principais mecanismos epigenéticos regulatórios. Adaptado de SAWAN *et al.*, 2008.

1.4.1 METILAÇÃO DO DNA

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos mais importantes e bem estudados dentre eles (LOPEZ-SERRA & ESTELLER, 2008). É o mecanismo chave na formação e manutenção da estrutura da cromatina, e está envolvido em processos importantes como a inativação do cromossomo X e o *imprinting* genômico, além de atuar de forma crítica na manutenção da homeostase celular e na regulação da transcrição (HERCEG, 2007; ESTELLER, 2008). Portanto, um padrão de metilação do DNA aberrante tem sido relacionado ao desenvolvimento de uma série de doenças, incluindo o câncer (ESTELLER, 2008).

A metilação do DNA é mediada pela ação das enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que adicionam um grupamento metil (-CH₃), proveniente de uma S-adenosil metionina (SAM), ao carbono 5 da citosina quando seguida por uma guanina, chamados de dinucleotídeos CpG (LEWANDOWSKA & BARTOSZEK, 2011) (**Figura 1.8**). Esta citosina metilada recebe então o nome de 5-metilcitosina (5mC) e costuma ser chamada de a quinta base do DNA (LOPEZ-SERRA & ESTELLER, 2008).

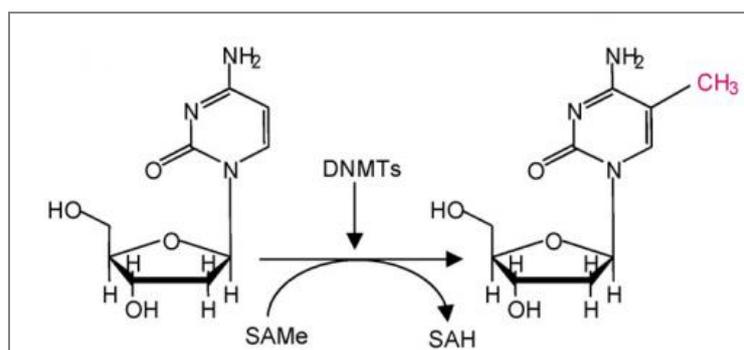


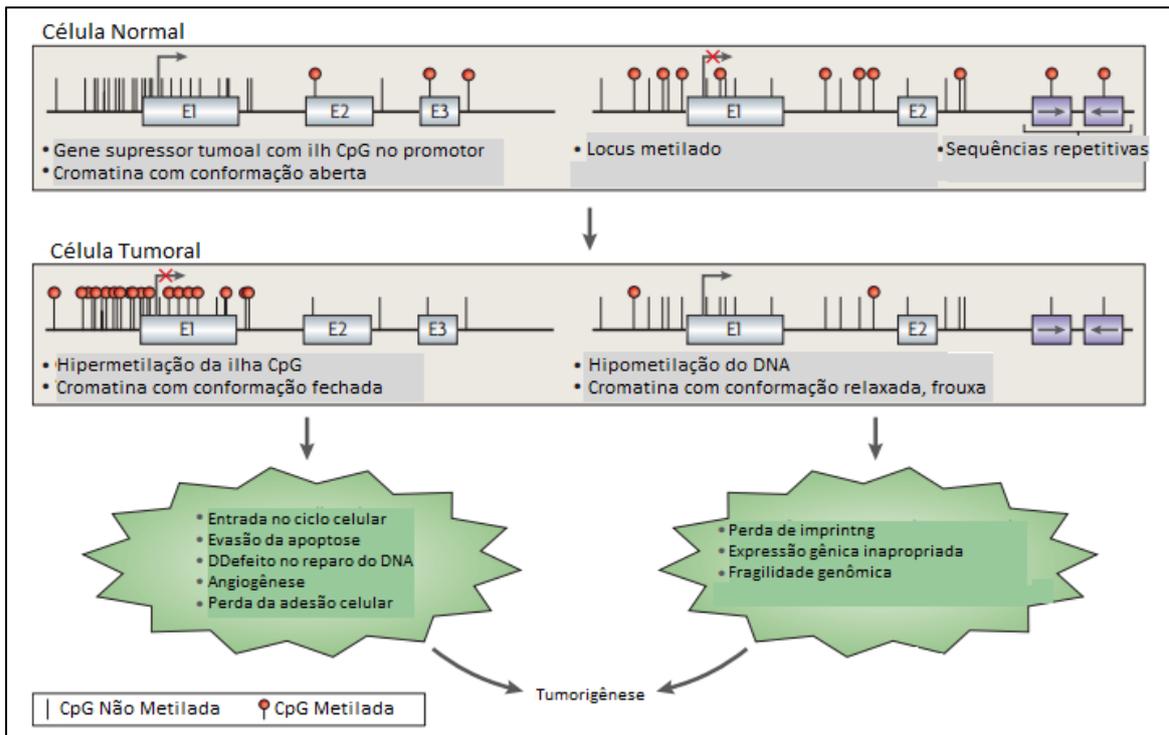
Figura 1.8: *Metilação do DNA.* A metilação do DNA em mamíferos ocorre quase que exclusivamente em resíduos de citosina contidas em dinucleotídeos CpG. O padrão de metilação é copiado e mantido durante a replicação do DNA em um processo catalisado pelas DNA metiltransferases (DNMTs). As DNMTs utilizam S-adenosil-L-metionina (SAMe) como fonte de grupamentos metil,

gerando S-adenosil homocisteína (SAH). As DNMTs catalisam a adição dos grupamentos metil no carbono 5. Adaptado de ZAKHARI, 2013.

A metilação dessa base desempenha importantes atividades no estabelecimento dos padrões epigenéticos e sua relevância em algumas desordens humanas, como o câncer (JONES & BAYLIN, 2002; HEYN & ESTELLER, 2012). Os dinucleotídeos CpG estão, em grande parte, localmente enriquecidos em sequências do DNA conhecidas como ilhas CpG (BIRD, 2002). Os dinucleotídeos CpG também são encontrados em sequências repetitivas, chamadas SINEs e LINEs (*short interspersed nuclear elements* e *long interspersed nuclear elements*). Em células normais, essas sequências se apresentam metiladas, impedindo, assim, a expressão de retrotransposons e promovendo a estabilidade do genoma. No entanto, em tumores, essas regiões se encontram geralmente hipometiladas, favorecendo, assim, a instabilidade genômica (BESTOR, 2000; REIK, 2007; LOPEZ *et al.*, 2009).

No contexto neoplásico, a tumorigênese é um processo de múltiplas etapas, incluindo iniciação, promoção e progressão, e multifatorial caracterizada pelo acúmulo de diferentes alterações, sendo genéticas, citogenéticas e epigenéticas (KINZLER & VOGELSTEIN, 1996). Em diversos tumores, observa-se um padrão de hipometilação a nível global do genoma, incluindo elementos transponíveis como SINE e LINE, o que leva ao aumento da instabilidade genômica, predispondo o indivíduo a mutações, deleções, ampliações, inversões e translocações. A hipometilação também resulta na reativação de genes normalmente silenciados, ativando vias relacionadas ao crescimento celular e mecanismos anti-apoptóticos (EHRlich, 2002; ISSA, 2008).

Outra alteração observada é a hipermetilação de genes supressores tumorais (ESTELLER, 2008). Cerca de 3 a 6% de todas as citosinas do genoma são metiladas em humanos, e em câncer, a hipermetilação é uma marcação epigenética chave para o processo de tumorigênese, contribuindo com o desenvolvimento de todos os típicos *hallmark* do câncer que resultam na inativação de genes supressores tumorais (HANAHAN & WEINBERG, 2000) **(Figura 1.9)**.



Abreviação: E, éxon.

Figura 1.9: Padrões de metilação alterados na tumorigênese. A hipermetilação de ilhas CpG em genes supressores tumorais é considerada uma alteração comum em células transformadas e esta resulta na inativação transcricional destes genes e a perda de suas funções normais. Este mecanismo epigenético contribui para aquisição de muitos dos *hallmarks* do câncer. Simultaneamente, o genoma da célula tumoral passa por uma hipometilação global em sequências repetitivas, genes *imprinting* e em genes tecido-específicos. Em alguns casos, esta hipometilação é conhecida por contribuir para o ganho do fenótipo tumoral, como perda de *imprinting* e ganho de instabilidade genômica. Adaptado de ESTELLER, 2007.

A metilação aberrante do DNA no genoma celular foi observada em vários tipos de câncer associados ao HPV (VIRMANI *et al.*, 2001; LLERAS *et al.*, 2013; DURZYNSKA *et al.*, 2017). Estudos identificaram CpG hipermetilados no promotor de alguns genes associados ao *status* de HPV (+) (DEGLI ESPOSTI *et al.*, 2017). Foram observados padrões distintos de metilação do DNA entre os tecidos tumorais derivados do mesmo local, como foi o caso dos

tecidos de câncer de cabeça e pescoço HPV negativos e HPV positivos, onde os tumores positivos para HPV mostraram aumento da metilação na região promotora de genes supressores de tumores em comparação com tumores HPV negativos, nos quais a hipometilação genômica global é mais observada (VAN KEMPEN *et al.*, 2014; LECHNER & FENTON, 2016; DURZYNSKA *et al.*, 2017).

Recentemente, foi identificada, num estudo de metiloma que nosso grupo participou, uma assinatura epigenética mínima composta por cinco sítios CpGs abrangendo três loci gênicos (*B3GALT6-SDF4*, *SYCP2-FAM127B* e *HTLF-HLTFAS1*) que apresentou alta especificidade (>95%) na identificação de casos HPV (+), independentemente da localização anatômica (DEGLI ESPOSTI *et al.*, 2017).

Um sítio CpG *HLTFAS1*, um sítio CpG *FAM217B* e três sítios CpGs *B3GALT6* compõe a assinatura epigenética mínima para a identificação de casos HPV positivos independente do sítio tumoral (DEGLI ESPOSTI *et al.*, 2017).

O gene *B3GALT6* codifica a proteína beta-1,3-galactosiltransferase 6, localizado no 1p36.33 e os três sítios CpG de interesse estão no éxon 1. O gene *HLTFAS1* é um RNA não codificante, antissenso, localizado no 3q24 e o sítio CpG de interesse está no íntron 1. O gene *FAM217B* codifica uma proteína ainda não caracterizada (C20orf177), localizado no 20q13.33 e o sítio CpG de interesse está no éxon 6 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>).

1.4.2 LINE-1

Os retrotransposons dos longos elementos nucleares intercalados-1 (LINEs-1), são “genes saltadores” que compreendem a 17% do DNA humano. Eles utilizam um mecanismo de "copiar e colar" para se propagarem ao longo do genoma através de RNAs intermediários, um processo denominado retrotransposição. Nas células malignas, no entanto, os *LINEs-1* são aberrantemente ativados e podem ter um papel na instabilidade do genoma, uma das características da patogênese do câncer. Seus *status* de metilação e

atividades de retrotransposição estão associados e atuam durante a iniciação e progressão do câncer, representando, assim, biomarcadores diagnósticos promissores e alvos terapêuticos (XIAO-JIE *et al.*, 2016).

O papel crescente da metilação aberrante na biologia do CCEO sugere fortemente a oportunidade de testar marcadores de metilação como potenciais indicadores de prognóstico para a doença. Além dos estudos que investigam o papel prognóstico do *status* de metilação de genes específicos, o estudo do metiloma, que engloba a totalidade dos sítios metilados de DNA genômico, tem gerado um crescente interesse devido ao seu valor promissor como marcador prognóstico para o câncer humano (HEYN & ESTELLER, 2012; SIGALOTTI *et al.*, 2012).

Seguindo esta linha, a hipometilação de LINE-1, um substituto amplamente aceito do conteúdo global de metilação do DNA genômico, tem sido associado à sobrevida global e/ou livre de doença em diversos tipos de câncer (OGINO *et al.*, 2008; PATTAMADILOK *et al.*, 2008; SAITO *et al.*, 2010; VAN HOESEL *et al.*, 2012; IWAGAMI *et al.*, 2013; SHIGAKI *et al.*, 2013). No entanto, a hipometilação LINE-1 também se correlaciona com uma melhor sobrevida global em várias neoplasias malignas, sugerindo que os efeitos biológicos subjacentes da hipometilação de LINE-1 no resultado do paciente podem depender do tipo histopatológico tumoral (ROMAN-GOMEZ *et al.*, 2006; SIGALOTTI *et al.*, 2011).

Além do seu potencial papel como biomarcador prognóstico, o nível de metilação de LINE-1 pode ser útil para avaliar o risco de recidiva e/ou prever a eficácia terapêutica dos protocolos de tratamento do câncer (BABA *et al.*, 2014). Embora vários estudos tenham avaliado o papel prognóstico da metilação LINE-1 no CCECP, seus resultados ainda são inconclusivos (FURNISS *et al.*, 2008; RICHARDS *et al.*, 2009; POAGE *et al.*, 2011; SARTOR *et al.*, 2011).

Apenas um estudo investigou a influência do nível global de metilação do DNA genômico para LINE-1 no risco precoce de recidiva em CCEO, onde a hipometilação de LINE-1 está associada a um maior risco de desenvolver recidiva precoce em pacientes com CCEO. Conseqüentemente, tal resultado sugere que a avaliação do *status* de metilação LINE-1 pode contribuir no

seguimento dos pacientes pós-tratamento e/ou na escolha da intensidade do tratamento em pacientes com CCEO pertencentes ao grupo hipometilado. No entanto, estudos futuros envolvendo populações maiores devem ser realizados para confirmar tal achado (FURLAN *et al.*, 2017).

1.5 JUSTIFICATIVA

O tabagismo e consumo de álcool são reconhecidos como os principais fatores de risco, mas a infecção por HPV tem sido identificada como um fator causal para um número crescente de CCEO, principalmente de pacientes em países desenvolvidos (HERRERO *et al.*, 2003; CHATURVEDI *et al.*, 2011; ANANTHARAMAN *et al.*, 2013). No Brasil, ainda faltam informações sobre a transição epidemiológica ocorrida nos países desenvolvidos em relação à etiologia e perfil dos pacientes com CCEO (INCA, 2012).

A incidência de CCE de boca tem diminuído nos últimos anos em muitas partes do mundo, de acordo com declínio no uso do tabaco (FRANCESCHI *et al.*, 2000). Em contraste, a incidência CCEO tem aumentado ao longo dos últimos 20 anos em vários países, incluindo Austrália, Canadá, Holanda, Estados Unidos e Reino Unido. Esses padrões de incidência divergentes levaram à hipótese de uma exposição diferente ao tabaco, e logo a infecção por HPV foi considerada a responsável pelo aumento da incidência do CCEO (GILLISON *et al.*, 2012; CHATURVEDI *et al.*, 2013).

Publicações recentes demonstraram que alguns biomarcadores como o HPV, *TP53*, *CDKN2A*, *PTEN*, *HRAS*, *PIK3CA* e LINE-1 apresentam impacto no prognóstico do CCEO (CHATURVEDI *et al.*, 2013; EL-NAGGAR *et al.*, 2017; FURLAN *et al.*, 2017). No entanto, na população brasileira, existem poucos estudos que investigaram a incidência do CCEO, e a sobrevida deste tumor revela-se baixa e sem alterações significativas apesar da introdução de novos tratamentos (CHERNOK *et al.*, 2009; FISCHER *et al.*, 2010).

A profunda mudança epidemiológica, devido à introdução carcinogênica do HPV associado do CCEO em muitos países ocidentais, tem catalisado o reconhecimento de duas coortes clínicas distintas. Essas descobertas criaram

novas oportunidades para melhorar a terapia e a prevenção primária para o CCEO (BERMAN & SCHILLER, 2017).

O entendimento dessa transição epidemiológica num serviço de oncologia exclusivamente público do Brasil tem impacto direto sobre o tratamento do CCEO, com considerável efeito sobre a qualidade de vida e a reabilitação social dos pacientes, além dos custos terapêuticos. Compreender o ônus do CCEO associados ao HPV no Brasil pode ter implicações importantes na prevenção, potencialmente através da vacinação profilática do HPV e da provável política de vacinação masculina, além do impacto direto sobre o diagnóstico e tratamento dos pacientes através da introdução de novos biomarcadores.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estabelecer o perfil dos pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe diagnosticados no INCA de 1999 a 2010, quanto às características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar por imuno-histoquímica a expressão da proteína p16 na população de estudo;
- 2) Avaliar através da reação em cadeia da polimerase quantitativa a presença do gene *E6* do HPV do tipo 16 na casuística;
- 3) Avaliar o perfil de metilação de LINE-1, *HLTF-AS1*, *FAM217B* e *B3GALT6* em amostras de tecido tumoral de carcinoma de células escamosas de orofaringe;
- 4) Associar as alterações moleculares identificadas nos tumores com os dados clínico-patológicos dessa população;
- 5) Associar as alterações moleculares detectadas com recidivas, acometimento de linfonodos e sobrevida na população do estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA sob o número CAAE 60480316.0.0000.5274 (**Anexo 8.1**) e teve como fonte financiadora a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) sob o número de processo APQ-1/208538/2014.2 (**Anexo 8.2**) e Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq). Tal estudo foi desenvolvido no Laboratório do Programa de Carcinogênese Molecular (PCM) do Centro de Pesquisas (CPQ) e na Divisão de Patologia (DIPAT) do INCA.

3.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Esse estudo é uma coorte retrospectiva que utiliza material em parafina referente às biópsias ou peças cirúrgicas oriundas de pacientes com carcinomas de células escamosas de orofaringe diagnosticados no período entre 1º de janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2010 no Hospital de Câncer I (HCI) do INCA. Foram incluídos no grupo de estudo os pacientes com tumor primário de orofaringe e com diagnóstico de CCE confirmado por exame histopatológico. Foram excluídos os pacientes com tumores primários ocultos da orofaringe, sem informação de acompanhamento, cujos blocos de parafina representativos do tumor não estavam disponíveis ou não apresentavam material representativo do tumor ou mal conservado.

Os dados sociodemográficos, clínico-patológicos e de acompanhamento da população selecionada foram coletados dos prontuários e armazenados. Dos prontuários de cada um dos pacientes foram compiladas as informações dos CCE de orofaringe demonstradas na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1: *Dados sociodemográficos, clínico-patológicos e de acompanhamento coletados da população de estudo.*

Dados do paciente	Sexo
	Cor da pele
	Escolaridade
	Tabagismo
	Etilismo
	Data de entrada
	Data de nascimento
Informações sobre a doença	Data da biópsia
	Data da confirmação do diagnóstico pelo INCA
	Localização
	Outros tumores
Informações sobre o tratamento	TNM clínico
	Estadiamento clínico
	Tratamento inicial
	Data do tratamento inicial
	Tratamento adjuvante
Informações sobre a cirurgia	Data do término do tratamento
	Esvaziamento cervical
	Margens livres
	TNM patológico
	Estadiamento patológico
	Progressão da doença
Dados do acompanhamento	Recidiva
	Tipo de recidiva
	Segundo tumor primário
	Óbito
	Data sem evidência de doença
	Data da recidiva
	Data da última consulta
Data do segundo tumor primário	
Informações histopatológicas	Data do óbito
	Gradação da OMS da biópsia
	Gradação da OMS da cirurgia
	Espessura do tumor
	Invasão perineural

3.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Todos os casos foram revisados através das lâminas histopatológicas de rotina, coradas por hematoxilina e eosina (HE), para aplicação da gradação histopatológica da Organização Mundial de Saúde - OMS (EL-NAGGAR *et al.*, 2017) e da classificação descritiva proposta por BRODERS, 1941. Novos recortes em HE foram realizados, e essas lâminas foram avaliadas ao microscópio óptico de luz por dois observadores (SQCL e LAB), separadamente. Em caso de dúvida ou impasse, um terceiro observador (LWP) foi consultado, segundo as características histopatológicas propostas por cada sistema de classificação.

3.2.1 GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA OMS

Para o emprego da classificação proposta pela OMS (EL-NAGGAR *et al.*, 2017), o critério utilizado foi o grau de diferenciação celular, classificando os CCE de orofaringe em bem, moderadamente e pouco diferenciados.

Os CCE bem diferenciados apresentam sua arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal de epitélio escamoso, com grandes células diferenciadas escamosas semelhantes a ceratinócitos e pequenas células do tipo basal, geralmente localizadas na periferia das ilhas tumorais. Exibem pontes intercelulares, ceratinização completa e mitoses escassas. Os CCE moderadamente diferenciados apresentam mais pleomorfismo nuclear e mitoses, incluindo mitoses atípicas, normalmente com menos ceratinização. Já naqueles que se mostram pouco diferenciados, há o predomínio de células basais, com numerosas mitoses típicas e atípicas, pontes intercelulares pouco visíveis e ceratinização mínima ou ausente (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). A gradação histopatológica proposta pela OMS pode ser visualizada na tabela e na figura a seguir (**Tabela 3.2** e **Figura 3.1**).

Tabela 3.2: Gradação histopatológica proposta pela OMS, baseada na diferenciação celular (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

	BEM DIFERENCIADO	MODERADAMENTE DIFERENCIADO	POUCO DIFERENCIADO
Semelhança com o epitélio de origem	Muita	Intermediária	Pouca
Ceratinização	Abundante	Intermediária	Mínima
Pleomorfismo celular e nuclear	Presente	Intermediário	Predomina
Pontes intercelulares	Nítidas	Intermediária	Pouco nítidas
Atividade mitótica (mitoses típicas e atípicas)	Presente	Evidente	Numerosa

Adaptado de EL-NAGGAR *et al.*, 2017.

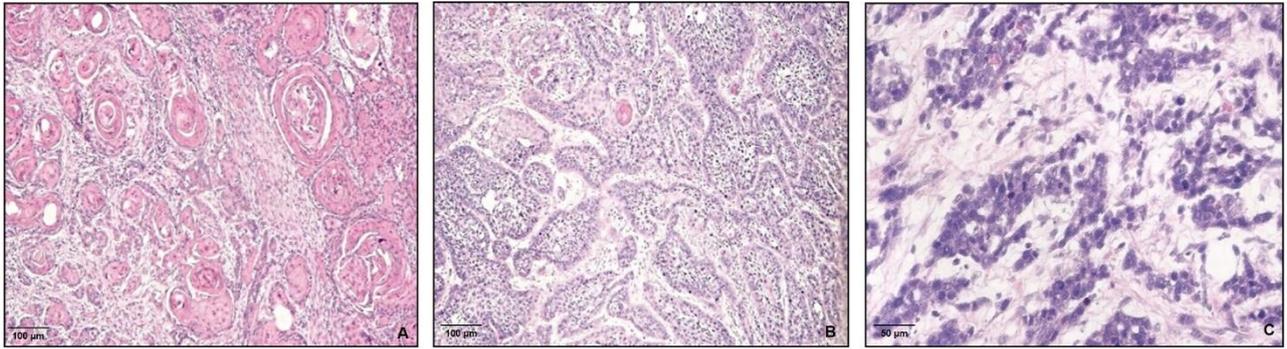


Figura 3.1: Gradação histopatológica da OMS. **A** Bem diferenciado; **B** Moderadamente diferenciado; **C** Pouco diferenciado (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

3.2.2 CLASSIFICAÇÃO DESCRITIVA POR BRODERS

Em 1920, Broders propôs um método para a gradação do carcinoma de células escamosas. A classificação estabelecida em 1920, posteriormente, revisada em 1925 baseou-se no princípio fundamental de diferenciação celular. Tal classificação observa a presença de células heterogêneas no câncer, com processo de maturação diferenciado em relação ao tecido hospedeiro, sendo uma classificação totalmente dissociada da história clínica do paciente (BRODERS, 1941; LOURENÇO *et al.*, 2007).

Os carcinomas foram divididos em quatro graus, variando de 1 a 4. Carcinomas grau 1 apresentavam até 25% de células indiferenciadas. Aqueles de grau 2 possuíam de 25% a 50% de indiferenciação. Os de grau 3 apresentavam células indiferenciadas ocupando de 50% a 75% do tumor e, naqueles de grau 4, observava-se indiferenciação de 75% a 100% do tumor (BRODERS, 1941).

A classificação descritiva proposta por BRODERS pode ser visualizada na tabela a seguir (**Tabela 3.3**).

Tabela 3.3: Classificação descritiva para o CCE (BRODERS, 1941).

PARÂMETRO	CARACTERÍSTICAS
Grau 1	0 a 25% de células indiferenciadas
Grau 2	25 a 50% de células indiferenciadas
Grau 3	50 a 75% de células indiferenciadas
Grau 4	75 a 100% de células indiferenciadas

Adaptado de BRODERS, 1941.

3.3 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

3.3.1 REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise imuno-histoquímica foi realizada no Laboratório de Suporte à Pesquisa e Biologia Molecular da Divisão de Patologia (DIPAT), do INCA. Foi utilizado o anticorpo anti-p16^{INK4a} (clone E6H4™/Roche®) do *CINtec Histology kit* (Roche mtm Laboratories, AG, Germany) num valor de referência ao sistema de automação *Ventana BenchMark XT Autostainer*, pela técnica multimérica automatizada em todos os blocos selecionados, contendo tumor (**Tabela 3.4**).

Foram feitos dois recortes seriados na espessura de 3 µm usando um micrótomo Leica Biosystems® de cada bloco selecionado para o estudo. Estas seções foram cortadas em lâminas com carga (SuperFrost® Plus, VWR). Após os cortes, as lâminas foram submetidas a um sistema de detecção baseado em tecnologia multimérica automatizado (BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Inc.) com utilização do anticorpo primário para detecção da proteína p16^{INK4a}. O anticorpo primário foi adquirido pré-diluído e, portanto, pronto para uso. As reações de imuno-histoquímica foram realizadas de acordo com protocolo estabelecido após a padronização dos anticorpos testados.

Inicialmente, foi feita a desparafinização dos cortes, utilizando a solução *EZ Prep* (Ventana, Roche®, USA), e as lâminas foram aquecidas a 76°C por quatro minutos. A seguir, a recuperação antigênica para imunomarcagem com o anticorpo anti-p16 foi realizada com a utilização de tampão de pH alto *CC1* aquecido a 37°C (Ventana, Roche®, USA) por 60 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas com a solução *Reaction Buffer* (Ventana, Roche®, USA) a 37°C e incubadas por quatro minutos nessa mesma solução. A seguir, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas, utilizando uma gota de *UV Inhibitor* (Ventana, Roche®, USA) nas lâminas por quatro minutos, seguida de lavagem com a solução *Reaction Buffer* (Ventana, Roche®, USA).

Em seguida, foram aplicados 100 µL do anticorpo primário através do *Prep Kit* (Ventana, Roche®, USA) - dispensador que vem preenchido com anticorpo pronto para uso na diluição ideal. As lâminas com anticorpo anti-p16 foram incubadas a 37°C por 16 minutos. E depois foi realizada uma nova lavagem com *Reaction Buffer* (Ventana, Roche®, USA).

Após essa etapa, foi realizada a aplicação do multímero da reação através da solução *UV HRP UNIV MULT* (Ventana, Roche®, USA) nas lâminas durante oito minutos. Após, seguiu-se outra lavagem com a solução *Reaction Buffer* (Ventana, Roche®, USA).

Para revelação da reação, as lâminas foram incubadas por oito minutos com uma gota de *UV DAB* (Ventana, Roche®, USA) e uma gota de *UV DAB H₂O₂* (Ventana, Roche®, USA), lavadas com *Reaction Buffer* (Ventana, Roche®, USA) e, após incubação com uma gota de UV COPPER por quatro minutos, foram novamente lavadas com *Reaction Buffer* (Ventana, Roche®, USA).

As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina (Ventana, Roche®, USA) por oito minutos, lavadas com *Reaction Buffer* e diferenciadas com uma gota do pós-contrastante *Bluing Reagent* (Ventana, Roche®, USA). Em seguida, as lâminas foram retiradas do equipamento (BenchMark XT, Ventana Medical Systems, Inc.).

Por fim, foi feita a desidratação dos cortes em três banhos de álcool a 95% (cinco minutos cada); três banhos de álcool absoluto (cinco minutos cada), seguida por seis banhos de xilol, por cinco minutos cada, para clarificação. As lamínulas foram montadas com Enthellan® (Merck) e avaliadas ao microscópio de luz.

Em todas as lâminas foram incluídos controles positivos previamente estabelecidos e controles negativos em todas as reações, elaborados a partir

da omissão do anticorpo primário, de forma a assegurar a sensibilidade das reações (**Tabela 3.4**).

Tabela 3.4: *Protocolo utilizado na reação imuno-histoquímica referente ao anticorpo aplicado na presente população de estudo.*

ANTICORPO PRIMÁRIO	CLONE	FORNECEDOR	TEMPO NO ANTICORPO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	ANTICORPO SECUNDÁRIO	DAB	CONTROLE POSITIVO E NEGATIVO
Anti-p16 ^{INK4a}	E6H4 TM	Roche	16 min	CC1 pH alto	Multímero	8 min	Adenocarcinoma de colo de útero

3.3.2 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os resultados imuno-histoquímicos foram analisados por dois observadores, separadamente, e quando houve dúvida, os casos foram revistos para chegar a um consenso. Primeiramente, as lâminas foram avaliadas quanta à positividade e negatividade das células neoplásicas para a proteína p16. Em seguida, foi avaliada a imunopressão semi-quantitativa de cada caso, segundo EVANS *et al.* (2013) foram classificados como positivos para HPV os casos com marcação de p16 nuclear e citoplasmática forte e difusa presente em mais de 70% das células malignas. Todos os outros padrões de marcação foram classificados como negativos (**Figura 3.2**).

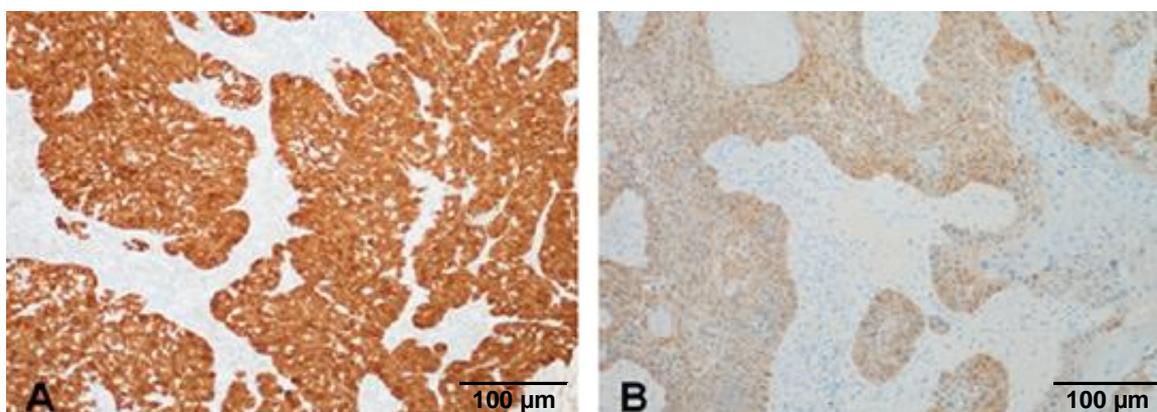


Figura 3.2: *CCE de amígdala demonstrando testes para HPV. A Resultado imuno-histoquímico positivo para p16. B Resultado imuno-histoquímico para*

p16 que foi julgado como negativo por consenso (Adaptado de THAVARAJ *et al.*, 2011).

3.4 ANÁLISE MOLECULAR

A análise molecular foi realizada no Laboratório do PCM, CPQ, INCA.

3.4.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDO PARAFINADO

A extração foi realizada como descrito pelo manual de uso do *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (QIAGEN®). Desta forma, foram utilizadas para a extração de DNA seis seções com 10 µm de espessura dos blocos contendo material de ressecção cirúrgica ou biópsia de CCE de orofaringe.

Esta etapa foi seguida do processo de desparafinização realizado a partir da adição de 1 mL de xilol aos cortes isolados em microtubos, homogeneização com o uso de equipamento de geração de vortex por 10 segundos e centrifugação a 14.000 rpm por cinco minutos para a sedimentação do material celular, seguida da remoção do sobrenadante com a pipeta. A retirada do xilol ocorreu com a adição de 1 mL de álcool etílico absoluto nos microtubos contendo o material, homogeneização com o uso de equipamento de geração de vortex por 10 segundos e centrifugação a 12.000 rpm por 10 minutos para a sedimentação do material celular. Seguido da remoção do sobrenadante com a pipeta. O resíduo de álcool etílico foi evaporado a partir do acondicionamento dos microtubos a uma temperatura de 37°C por 10 minutos.

Foram então adicionados tampão de digestão (ATL) e proteinase K, fornecidos no kit, homogeneização com o uso de equipamento de geração de vortex por 10 segundos e as amostras foram incubadas a 56°C por uma hora no equipamento *Thermomixer Comfort* (EPPENDORF®). A inativação da proteinase K foi realizada pela manutenção das amostras a 90°C em agitação constante durante 1 hora. As amostras foram então centrifugadas brevemente a 12.000 rpm e foram adicionados 200 µL de tampão de ligação AL e 200 µL

de álcool etílico absoluto. Após a homogeneização das soluções e centrifugação breve a 12.000 rpm, este conteúdo foi então transferido para a uma coluna com tubo coletor (*QIAamp MinElute column*) e centrifugado a 8.000 rpm por dois minutos. A solução coletada no tubo foi descartada. Adicionou-se em seguida 500µL de tampão de lavagem (AW1) à coluna e esta foi centrifugada a 8.000 rpm por dois minutos. A solução coletada no tubo foi descartada. Foram adicionados em seguida 500 µL de um segundo tampão de lavagem (AW2) à coluna e esta foi centrifugada a 8.000 rpm por dois minutos. A solução coletada no tubo foi descartada. Foi realizada uma centrifugação a 14.000 rpm por três minutos para a retirada de qualquer resíduo do tampão. O tubo coletor foi então descartado e substituído por um microtubo de capacidade de 1,5 mL. Em seguida, foram acrescentados ao centro da coluna 50 µL de tampão de eluição (ATE). Por fim, este material foi centrifugado a 14.000 rpm por um minuto e o DNA coletado foi estocado em refrigeração a -20°C.

3.4.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Uma alíquota do material extraído (2 µL) foi quantificada através da leitura de absorvância em espectrofotômetro *NanoDrop* (Uniscience®) utilizando comprimento de onda igual a 260 nm. A pureza do DNA foi verificada a partir da leitura a 280 nm, para a detecção de uma eventual contaminação da amostra por proteínas. Quando a relação das densidades óticas, A_{260}/A_{280} , foi igual ou maior que 1,7, o material foi considerado puro.

3.4.3 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE – *β-Actina*

A técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizada para amplificar a região do DNA genômico correspondente ao gene *β-actina* (250 pb) para avaliação da viabilidade de amplificação das amostras incluídas no estudo. As condições específicas da reação estão ilustradas na Tabela 3.5,

sendo que estas e as concentrações finais dos reagentes foram padronizadas no laboratório do PCM (**Tabela 3.5**).

Tabela 3.5: Condições da reação de PCR: região amplificada, oligonucleotídeos específicos, temperatura de anelamento e o tamanho do produto amplificado.

GENE	OLIGONUCLEOTÍDEOS 5' – 3'	TEMPERATURA DE ANELAMENTO	TAMANHO DO PRODUTO
<i>β-ACTINA</i>	S: CCAGTGGCTTCCCCAGTGT AS: ATGAGGTAGTCAGTCAGGTCCC	58°C	250 pb

Abreviações: Senso, S; Antissenso, AS.

A reação de PCR para *β-actina* foi realizada utilizando 2,5 µL tampão de PCR 10X (INVITROGEN®), 0,75 µL de MgCl₂ 50 mM (INVITROGEN®), 0,5 µL de mistura de dNTPs 10 mM, 0,5 µL de DNA polimerase Taq *Platinum* (INVITROGEN®), 0,5 µL de cada par de oligonucleotídeos 10 pmol/µL (senso e antissenso), 50 ng de DNA a ser amplificado e água ultra pura estéril para completar o volume final de reação de 25 µL. Todas as reações foram feitas em duplicata.

A amplificação deste gene foi realizada no termociclador *Veriti* (Applied Biosystems®), com uma pré-desnaturação (5 minutos a 95°C), seguida de 50 ciclos consistindo de três etapas: desnaturação (30 segundos a 95°C), anelamento (45 segundos a 58°C) e extensão (30 segundos a 72°C) e uma extensão final por 10 minutos a 72°C. Os produtos das reações de amplificação de *β-actina* foram então visualizados em gel de agarose 2% como ilustrado na **Figura 3.3**.

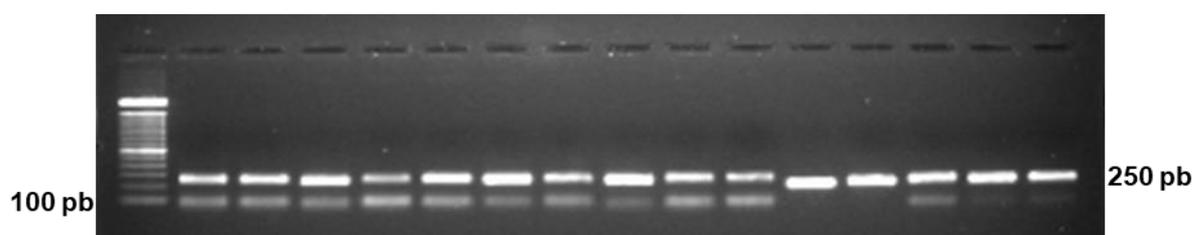


Figura 3.3: Foto de eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar a amplificação do fragmento do gene β -actina (250 pb). As bandas específicas presentes nas linhas 2 - 16 são referentes à amplificação a partir de DNA extraído de material parafinado.

3.4.4 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA (PCRQ) – E6 HPV 16

A técnica de PCRq foi utilizada para avaliar a presença do DNA do HPV do tipo 16 a partir da amplificação do gene *E6* do HPV. A sequência dos oligonucleotídeos específicos para amplificação de segmento do gene (ZHAO *et al.*, 2005) e as demais informações sobre a reação de PCR em tempo real encontram-se na **Tabela 3.6**.

Tabela 3.6: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores da reação de PCRq.

GENE	OLIGONUCLEOTÍDEOS 5' – 3'	TAMANHO DO PRODUTO
E6 HPV 16	S: TCAGGACCCACAGGAGCG	120 pb
	AS: CCTCACGTGCGCAGTAACTGTTG	

Abreviações: Senso, S; Antissenso, AS.

As reações foram realizadas na plataforma *Rotor-gene* (QIAGEN®). Em cada reação foram adicionados 5 μ L de tampão *SYBR green FAST 2x* (QIAGEN®), 1 μ L de cada um dos oligonucleotídeos específicos da reação a 10 pmol/ μ L (senso e antissenso), 25 ng de DNA a ser amplificado e água ultra pura estéril para completar o volume final de reação de 10 μ L. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

A ciclagem consistiu de uma incubação a 95°C por cinco minutos, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95°C por cinco segundos e anelamento/amplificação a 60°C por 10 segundos. Após cada ciclo, a fluorescência foi capturada. Ao fim da reação, foi adicionada uma curva de dissociação (Curva de *Melt*) a fim de verificar a formação de produtos inespecíficos, formação de estruturas secundárias e contaminação na reação.

Para a determinação da eficiência dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene foi estabelecida uma curva padrão de amplificação utilizando uma diluição seriada de DNA do controle positivo da reação (adenocarcinoma de colo de útero).

Para esta padronização foram utilizados três casos de adenocarcinoma de colo de útero, visto que o desenvolvimento do câncer do colo de útero está diretamente relacionado a presença da infecção pelo HPV oncogênico. Os três casos selecionados haviam sido submetidos ao mesmo tipo de armazenamento e processamento que os casos de CCEO incluídos neste estudo. Os três controles utilizados como padrão apresentaram Ct médio de amplificação para o gene *E6* do HPV do tipo 16 de 27 ciclos.

A partir do estabelecimento desta curva, foram considerados positivos para HPV os casos que apresentassem um Ct de amplificação igual ou inferior ao do controle positivo, a partir da mesma quantidade de DNA (25 ng). Todos os outros casos foram classificados como negativos.

3.4.5 STATUS DO HPV

O *status* do HPV foi estabelecido a partir da combinação dos resultados da expressão da proteína p16 e da presença do gene *E6* do HPV do tipo 16. Os casos positivos tanto para p16 quanto para *E6* foram considerados positivos para a infecção pelo HPV. Todos os outros padrões foram considerados negativos para a presença do HPV.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO

3.5.1 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Com o objetivo de transformar as citosinas não metiladas em uracila (as citosinas metiladas permanecem inalteradas), 500 ng de DNA genômico foram submetidos ao tratamento com bissulfite de sódio, utilizando *EpiTect Bisulfite*

Kit (QIAGEN®), de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Após o tratamento, o DNA foi eluído em 20 µL do tampão de eluição fornecido no kit, de maneira que sua concentração final fosse de 25 ng/µL (**Figura 3.4**).

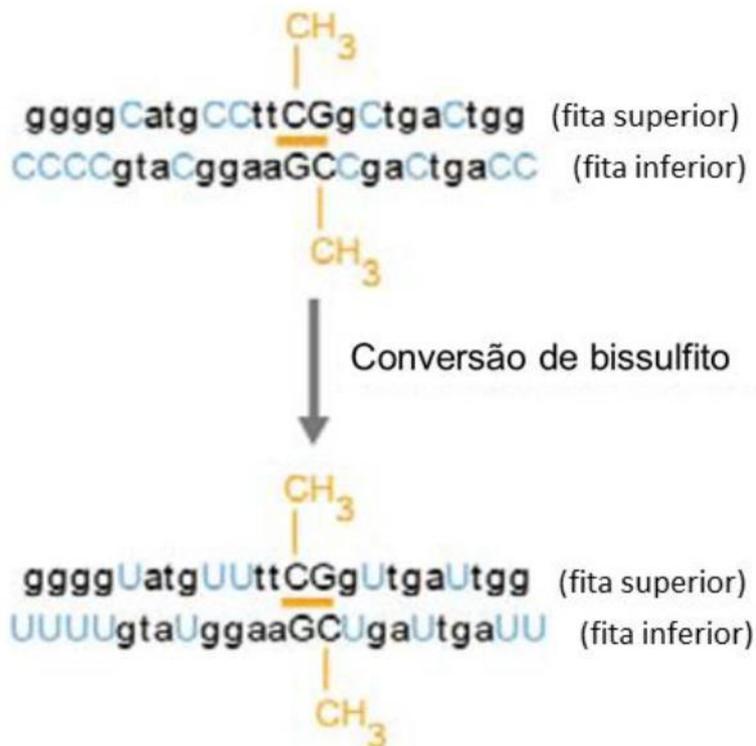


Figura 3.4: Princípio básico da conversão de bissulfito onde as citosinas não metiladas são convertidas em uracila (Adaptado de ILLUMINA, 2010).

3.5.2 ANÁLISE DE METILAÇÃO GLOBAL PELA AVALIAÇÃO DE LINE-1

Um total de 25 ng de DNA genômico foi amplificado utilizando *primers* específicos para o elemento transponível LINE-1 (família 1.2) (**Tabela 3.7**). Para que posteriormente apenas uma das fitas amplificadas seja selecionada, um dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR deve ser marcado com biotina. Além disso, foi incluída na sequência a ser analisada ao menos uma citosina que não fosse parte de um sítio CpG como controle interno da conversão com bissulfito de sódio.

Tabela 3.7: Sequência dos primers utilizados na análise de LINE-1 por pirosequenciamento.

ELEMENTO TRANSPONÍVEL	PRIMERS (DNA MODIFICADO) 5' – 3'	TEMPERATURA DE ANELAMENTO	TAMANHO DO PRODUTO
LINE-1 (família 1.2)	S: 5' biotina-TAGGGAGTGTTAGATAGTGG	56°C	108 pb
	AS: 5' ACCTCCCTAACCCCTTAC		
	SEQ: 5' AACTCCCTAACCCCTTAC		

Abreviações: Senso, S; Antissenso, AS; Sequência, SEQ.

A reação de PCR para LINE-1 foi realizada utilizando 5 µL de tampão de PCR 10X (INVITROGEN®), 1,5 µL de MgCl₂ 50 mM (INVITROGEN®), 1 µL de dNTPs 10 mM, 0,25 µL de DNA polimerase Taq *Platinum* (INVITROGEN®), 1 µL de cada oligonucleotídeos 10 pmol/µL (senso e antissenso), 2 µL (50 ng) de DNA a ser amplificado e água ultrapura estéril para completar o volume final de reação de 50 µL.

A amplificação de LINE-1 foi realizada no termociclador *Veriti* (Applied Biosystems®), com uma pré-desnaturação (15 minutos a 95°C), seguida de 50 ciclos consistindo de três etapas: desnaturação (40 segundos a 95°C), anelamento (40 segundos a 56°C) e extensão (40 segundos a 72°C) e extensão final por 10 minutos a 72°C. Os produtos das reações de PCR foram então visualizados em gel de agarose 2% como ilustrado na **Figura 3.5**.

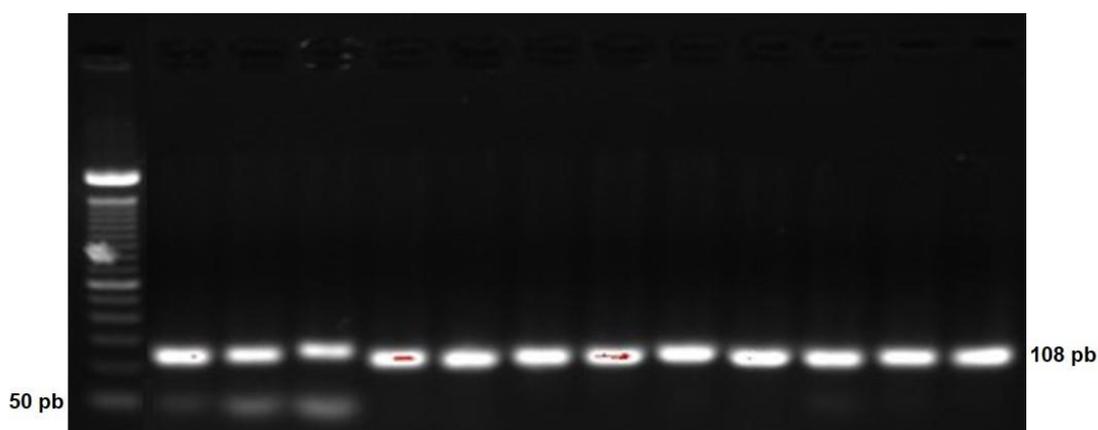


Figura 3.5: Foto de eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar a amplificação do fragmento do elemento transponível LINE-1 (108 pb). As bandas específicas presentes nas linhas 2 – 13 são referentes à amplificação a

partir de DNA extraído de material parafinado submetido a conversão com bissulfito de sódio.

3.5.3 ANÁLISE DE METILAÇÃO PARA AVALIAÇÃO DA ASSINATURA EPIGENÉTICA DA INFECÇÃO PELO HPV

A técnica quantitativa de pirosequenciamento foi utilizada para validar a assinatura epigenética da presença do HPV através dos genes *HLTF-AS1*, *FAM217B* e *B3GALT6*, já que mudanças de metilação nestes genes fornecem uma assinatura preditiva de *status* do HPV altamente específica (DEGLI ESPOSTI *et al.*, 2017).

Um total de 25 ng de DNA genômico foi amplificado utilizando *primers* específicos para cada gene de interesse (**Tabela 3.8**) (DEGLI ESPOSTI *et al.*, 2017). Para que posteriormente apenas uma das fitas amplificadas seja selecionada, um dos oligonucleotídeos utilizados na reação de PCR foi ser marcado com biotina. Além disso, foi incluída na sequência a ser analisada ao menos uma citosina que não seja parte de uma ilhota CpG como controle interno da conversão com bissulfito de sódio. A reação de PCR foi realizada em um volume final de 50 µL contendo Tampão 1X, 0,2 mM dNTP Mix, 0,2 mM de cada primer e 1,25 unidades de DNA polimerase *HotStarTaq* (QIAGEN®). A amplificação foi realizada nas seguintes condições: pré-desnaturação (15 minutos a 95°C), seguida de 50 ciclos de desnaturação (30 segundos a 95°C), anelamento (30 segundos na temperatura específica para cada par de *primers*) e extensão (30 segundos a 72°C). Os produtos das reações de PCR foram então visualizados em gel de agarose 2%. As condições específicas das reações estão ilustradas na **Tabela 3.8**.

Tabela 3.8: Sequências dos primers utilizados nas análises por pirosequenciamento.

Gene	Primers (DNA modificado) 5' – 3'	Temperatura de Anelamento	Tamanho do Produto
------	----------------------------------	---------------------------	--------------------

	S: 5' TATTTTATTTTATTTTGTGGTG		
HLTF-AS1	AS: 5' biotina-CTAAATTCATTTAAAATTTTCC	53°C	115 pb
	SEQ: 5' TTTGTGGTGAAT		
	S: 5' GTGATTTTTTTTTAGGGTTAT		
FAM217B	AS: 5' biotina-AAACCCTAAAAACCRCTACT	54°C	127 pb
	SEQ: 5' TAGGGTTATTTT		
	S: 5' GTGTTTTTGGGYGTTTGGT		
B3GALT6 SEQ1	AS: 5' biotina-CCAAATACTAATTACTACAAC	47°C	103 pb
	SEQ1: 5' TTAGYGGGAGTA		
	S: 5' TGGAGGATATGTTGGAGAAGTA		
B3GALT6 SEQ2	AS: 5' biotina-TAAAACAAACRCAACTACACCTC	56°C	82 pb
	SEQ2: 5' ATGTTGGAGAAGTA		

Abreviações: Senso, S; Antissenso, AS; Sequência 1, SEQ1; Sequência 2, SEQ2.

3.5.4 ANÁLISE DA METILAÇÃO DE SÍTIOS CPG POR PIROSEQUENCIAMENTO

Os produtos de PCR de LINE-1, *HLTF-AS1*, *FAM217B* e *B3GALT6* foram submetidos a análise da metilação de ilhotas CpG por pirosequenciamento, onde tais produtos foram coletados utilizando “beads” revestidas com estreptavidina diluídas em tampão de ligação (10 mM Tris-HCl; 2 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% Tween 20 – pH 7,6) com o objetivo de ligar apenas as fitas biotiniladas. Após dez minutos de agitação, as “beads” foram aspiradas utilizando a “*Vacuum Prep Workstation*”, lavadas com etanol 70%, seguida por desnaturação com NaOH e lavagem (10 mM Tris-Acetato – pH 7,6). Após a adição de 40 µL da solução de primer de sequenciamento 0,4 mM diluído em tampão de anelamento (20 mM Tris-Acetato; 2 mM MgAc₂ – pH 7,6), o MIX (“beads” e oligonucleotídeos) foi desnaturado por 2 minutos a 80°C e então resfriado por 20 minutos para atingir a temperatura de anelamento dos primers. Os volumes de dNTPs, enzimas e substrato foram definidos de acordo com a sequência sequenciada. A fita biotinilada foi então sequenciada com o sistema *PyroMark Q96* (QIAGEN®).

Esta técnica baseia-se no sequenciamento por síntese, onde temos a adição e incorporação sequencial de nucleotídeos. O nucleotídeo só é incorporado pela DNA polimerase se for complementar à fita molde, sendo que essa incorporação pode ser monitorada em tempo real. Inicialmente, um oligonucleotídeo desenhado especialmente para o sequenciamento se anela à fita simples do produto gerado na reação de PCR, a qual serve como molde para a síntese. São então adicionadas as enzimas DNA polimerase, ATP sulfúrilase, luciferase e apirase, assim como os substratos adenosina 5' fosfosulfato (APS) e luciferina. Em seguida, o primeiro desoxiribonucleotídeo trifosfato (dNTP) é adicionado à reação. Caso ele seja complementar à fita molde, a DNA polimerase o incorpora à fita que está sendo sintetizada. Cada incorporação é acompanhada da liberação de pirofosfato (PPi) em uma quantidade equimolar à quantidade de nucleotídeo incorporada. A enzima ATP sulfúrilase converte então o PPi em ATP na presença de APS. O ATP produzido é utilizado na conversão de luciferina em oxiluciferina (reação catalisada pela enzima luciferase) que gera luz em uma intensidade proporcional à quantidade de ATP. A luz produzida é captada e visualizada como um pico no gráfico luz X tempo, sendo que a altura de cada pico é proporcional à quantidade de nucleotídeos adicionados. Enquanto isso, a apirase degrada continuamente os nucleotídeos não incorporados e o ATP. Quando esta etapa é concluída, um novo nucleotídeo é adicionado.

O método de pirosequenciamento trata cada sítio CpG como um polimorfismo C/T e gera um dado quantitativo da proporção relativa do alelo metilado *versus* o alelo não metilado. Os níveis de metilação dos sítios CpG de interesse foram avaliados convertendo os pirogramas em valores numéricos correspondentes às alturas dos picos obtidos e calculando a média de todos os sítios CpG analisados para um promotor específico.

3.5.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE METILAÇÃO

Após os resultados do pirosequenciamento, a avaliação da metilação global através da análise de LINE-1 foi calculada o valor médio dos níveis de

metilação dos seis sítios CpGs de interesse. A mediana de metilação desse gene foi estabelecida como o valor de corte, onde os valores maiores ou iguais a mediana foram classificados como hipermetilados e conseqüentemente, os valores menores que a mediana como hipometilados para o gene LINE-1.

Já para a avaliação da assinatura epigenética da infecção pelo HPV foram utilizados os níveis médios de metilação, obtidos após resultados do pirosequenciamento, dos cinco sítios CpGs de interesse dos genes *HLTF-AS1*, *FAM217B* e *B3GALT6*, gerando assim o índice médio de metilação (IMM), onde o valor de corte foi de 0,75 (correspondente ao percentual de 75% de metilação). Dessa forma, as amostras com IMM menor que 0,75 foram classificadas como HPV positivas e logo, os casos com IMM maior ou igual a 0,75 foram classificados como HPV negativos (DEGLI ESPOSTI *et al.*, 2017).

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas através do programa SPSS® (*Statistical Package for Social Sciences*), versão 20.0 para *Windows* e do software *GraphPad Prism*®, versão 5 para *Windows*.

3.6.1 ANÁLISES DESCRITIVA E DE ASSOCIAÇÃO

As informações sociodemográficas, clínico-patológicas e de acompanhamento dos pacientes com CCE de orofaringe foram registradas nas fichas de coleta (**Anexo 8.3**), armazenadas em uma planilha do Microsoft Excel® e em um banco de dados elaborado no software Epi Info versão 3.5.1 *for Windows*. A análise descritiva das características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares foi realizada por meio de medidas de tendência central (média e mediana) e de dispersão (desvio padrão, valores mínimo e máximo) para as variáveis quantitativas e frequências absoluta e relativa para as variáveis qualitativas.

Para a avaliação da distribuição das variáveis quantitativas foi realizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Sendo a distribuição normal, foi calculada a diferença entre as médias dos grupos por meio do teste *T-student* (pareado ou não pareado). Já quando os dados não obedeceram à normalidade, foram utilizados testes não paramétricos (*Wilcoxon* ou *Mann-Whitney U* para amostras pareadas e não pareadas, respectivamente). As correlações de *Pearson* e de *Spearman* foram utilizadas para avaliarmos a relação entre duas variáveis cujos dados obedeceram a uma distribuição normal e não-paramétrica, respectivamente. A acurácia preditiva foi avaliada pela área sob a curva (AUC) para metilação de LINE-1 e assinatura epigenética do HPV.

Para avaliar a associação entre as variáveis sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares com o desfecho de interesse foi realizado o teste do Qui-quadrado e, quando necessário, o teste exato de *Fisher*.

As decisões estatísticas foram tomadas ao nível de significância de $p < 0,05$.

3.6.2 ANÁLISE DE SOBREVIDA

Foi feita a análise de sobrevida global, de sobrevida livre de doença e de sobrevida específica. Uma avaliação exploratória inicial foi realizada utilizando-se o método de Kaplan-Meier com o objetivo de identificar possíveis diferenças entre as curvas para cada grupo de exposição. O teste de *Log-Rank* foi utilizado para comparação entre os grupos. Na análise univariada, por meio do modelo dos riscos proporcionais de Cox, as variáveis com $p < 0,20$ foram selecionadas para o modelo múltiplo. Utilizando-se o método *enter* (*Stepwise Forward*), as variáveis previamente selecionadas foram introduzidas neste modelo, sendo a ordem de entrada definida pela significância estatística obtida na análise univariada. As variáveis com importância clínico-epidemiológica foram incluídas no modelo, mesmo que não apresentassem significância estatística. Foram retidas no modelo final as variáveis com $p < 0,05$.

Para a sobrevida global, foram consideradas as datas do óbito por qualquer causa, para sobrevida específica, do óbito por câncer de orofaringe e,

para a sobrevida livre de doença, da recidiva locorregional ou metástase à distância. As informações da causa e a data do óbito foram obtidas por meio do relato no prontuário físico e/ou eletrônico ou ainda, no Registro Hospitalar de Câncer. Para a sobrevida livre de doença a data da realização do exame de confirmação diagnóstica de recidiva ou metástase, obtida a partir do prontuário físico e/ou eletrônico, foi considerada para os dados de recidiva locorregional e metástase à distância. Já para a sobrevida global, foram considerados como dados censurados aqueles referentes a indivíduos vivos ao final do estudo e aqueles para os quais não se conseguiu comprovar a condição vital (perda de seguimento). Neste caso, foi considerada a data da última informação registrada em prontuário físico e/ou eletrônico. Na sobrevida específica, os óbitos por outras causas além do câncer de orofaringe foram censurados. O tempo de sobrevida global foi calculado a partir da data do início do tratamento na instituição até a data do óbito por qualquer causa ou último seguimento. O mesmo foi considerado para a sobrevida específica, que considerou a data do óbito por câncer de orofaringe ou decorrente do seu tratamento. Para sobrevida livre de doença, o tempo foi calculado a partir da data do final do tratamento até a data do diagnóstico de recidiva ou metástase.

O tempo de seguimento utilizado para as análises de sobrevida foi feito em 60 meses. Para todas as análises, p -valor menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS

Inicialmente, foram selecionados todos os pacientes contendo CCE exclusivos da orofaringe matriculados no INCA entre 01 janeiro de 1999 e 31 de dezembro de 2010, 1128 casos de CCE foram levantados, destes 220 casos foram excluídos devido à localização anatômica do tumor, não sendo possível estabelecer se o tumor era inicialmente da orofaringe ou de outro sítio de cabeça e pescoço. Então, 908 casos foram identificados, destes 471 casos tiveram que ser excluídos por serem casos de revisão de lâmina, não apresentando qualquer tipo de material representativo do tumor (bloco de parafina) para a realização dos experimentos. Dessa forma, 438 casos foram selecionados inicialmente para o estudo, mas destes 91 casos não continham informações de acompanhamento, haviam apenas sido matriculados no INCA, e logo excluídos do presente trabalho.

Partindo então do levantamento inicial, a população de interesse era de 908 (100%) pacientes e após a aplicações dos critérios de inclusão e exclusão foram considerados aptos a participar do estudo 346 (38,1%) pacientes, representando assim a população final do trabalho.

4.1 PERFIL DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram coletados os dados sociodemográficos e clínico-patológicos dos prontuários de 346 pacientes e observou-se que homens (89%), brancos (48%), com idade entre 41 e 60 anos (69%) foram os mais acometidos. A idade média foi de 57,53 anos e variou entre o máximo e o mínimo de 89 e 34 anos, respectivamente. Predominaram pacientes com primeiro grau incompleto (62,4%), tabagistas ou ex-tabagistas (94,6%) e etilistas ou ex-etilistas (88,2%) com tumores extensos, que contemplam dois ou mais sítios da orofaringe (68,8%) e localização isolada em palato mole (56,9%), em estadiamento clínico IV (54,9%), tratados com intenção curativa (54,3%), submetidos principalmente radioterapia exclusiva (45,7%) e que não realizaram tratamento adjuvante

(92,2%). Foram identificados 106 casos (30,6%) de recidiva, principalmente local (72,6%). A maioria dos pacientes não apresentou progressão da doença (75,7%). Também foi observada a predominância de pacientes que não apresentaram segundo tumor primário (95,1%) e 271 dos 346 pacientes (78,3%) haviam falecido até o encerramento da coleta de dados em dezembro de 2017, destes 97% tiveram óbito confirmado por câncer (**Tabela 4.1**).

Tabela 4.1: *Características sociodemográficas e clínico-patológicas dos pacientes (n=346).*

Variável	Categoria	n (%)
Sexo	Masculino	308 (89%)
	Feminino	38 (11%)
Cor da Pele	Branco	166 (48%)
	Pardo	114 (32,9%)
	Preto	66 (19,1%)
Idade	≤40 anos	8 (2,3%)
	41-60 anos	204 (59%)
	>60 anos	134 (38,7%)
Escolaridade	Analfabeto	42 (12,1%)
	1º grau incompleto	216 (62,4%)
	1º grau completo	38 (11%)
	2º grau incompleto	13 (3,8%)
	2º grau completo	27 (7,8%)
	Superior incompleto	4 (1,2%)
Tabagismo	Sim e ex	327 (94,5%)
	Não	19 (5,5%)
Etilismo	Sim, social e ex	305 (88,2%)
	Não	41 (11,8%)
Localização	Palato mole	177 (20,7%)
	Úvula	110 (12,8%)
	Loja amigdaliana	144 (16,8%)
	Amígdala	36 (4,2%)
	Pilar anterior	136 (15,8%)
	Pilar posterior	49 (5,7%)
	Parede lateral	65 (7,6%)
	Parede posterior	23 (2,8%)
	Valécula	36 (4,2%)
Base de língua	81 (9,4%)	
Sítios Tumorais	Único sítio	108 (31,2%)
	Dois ou mais sítios	238 (68,8%)
Tratamento Inicial	Cirurgia	30 (8,7%)
	Radioterapia exclusiva	158 (45,7%)
	Radioterapia e quimioterapia paliativa	68 (19,7%)
	Radioterapia paliativa	39 (11,3%)
	Paliativo	51 (14,7%)

Intenção do Tratamento	Curativa	188 (54,3%)
	Paliativa	158 (45,7%)
Tratamento Adjuvante	Sim	27 (7,8%)
	Não	319 (92,2%)
Estadiamento Clínico	I	26 (7,5%)
	II	43 (12,4%)
	III	87 (25,1%)
	IV	190 (54,9%)
Progressão da Doença	Sim	84 (24,3%)
	Não	262 (75,7%)
Recidiva	Sim	106 (30,6%)
	Não	240 (69,4%)
Tipo de Recidiva	Local	77 (72,6%)
	Regional	18 (17%)
	À distância	11 (10,4%)
Segundo Tumor Primário	Sim	17 (4,9%)
	Não	329 (95,1%)
Óbito	Sim	271 (78,3%)
	Não	75 (21,7%)
Óbito por Câncer	Sim	256 (97%)
	Não	8 (3%)

4.2 HISTOPATOLÓGICOS

A análise histopatológica foi realizada através da revisão das lâminas de todos os tumores com aplicação da gradação histopatológica da OMS (EL-NAGGAR *et al.*, 2017) e classificação descritiva de Broders (BRODERS, 1941) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Características histopatológicas dos pacientes (n=346).

Variável	Categoria	n (%)
Gradação Histopatológica (OMS)	Bem diferenciado	12 (3,5%)
	Moderadamente diferenciado	276 (79,8%)
	Pouco diferenciado	58 (16,8%)
Classificação Descritiva (Broders)	Grau 1	12 (3,5%)
	Grau 2	137 (39,6%)
	Grau 3	139 (40,2%)
	Grau 4	58 (16,8%)

Predominaram os tumores moderadamente diferenciados (79,8%) pela gradação histopatológica da OMS (2017) e de grau 3 (40,2%) através da classificação descritiva proposta por BRODERS (1941) (Figura 4.1 e Figura 4.2).



Figura 4.1: *Gradação histopatológica da OMS.* **A** Bem diferenciado; **B** Moderadamente diferenciado; **C** Pouco diferenciado.

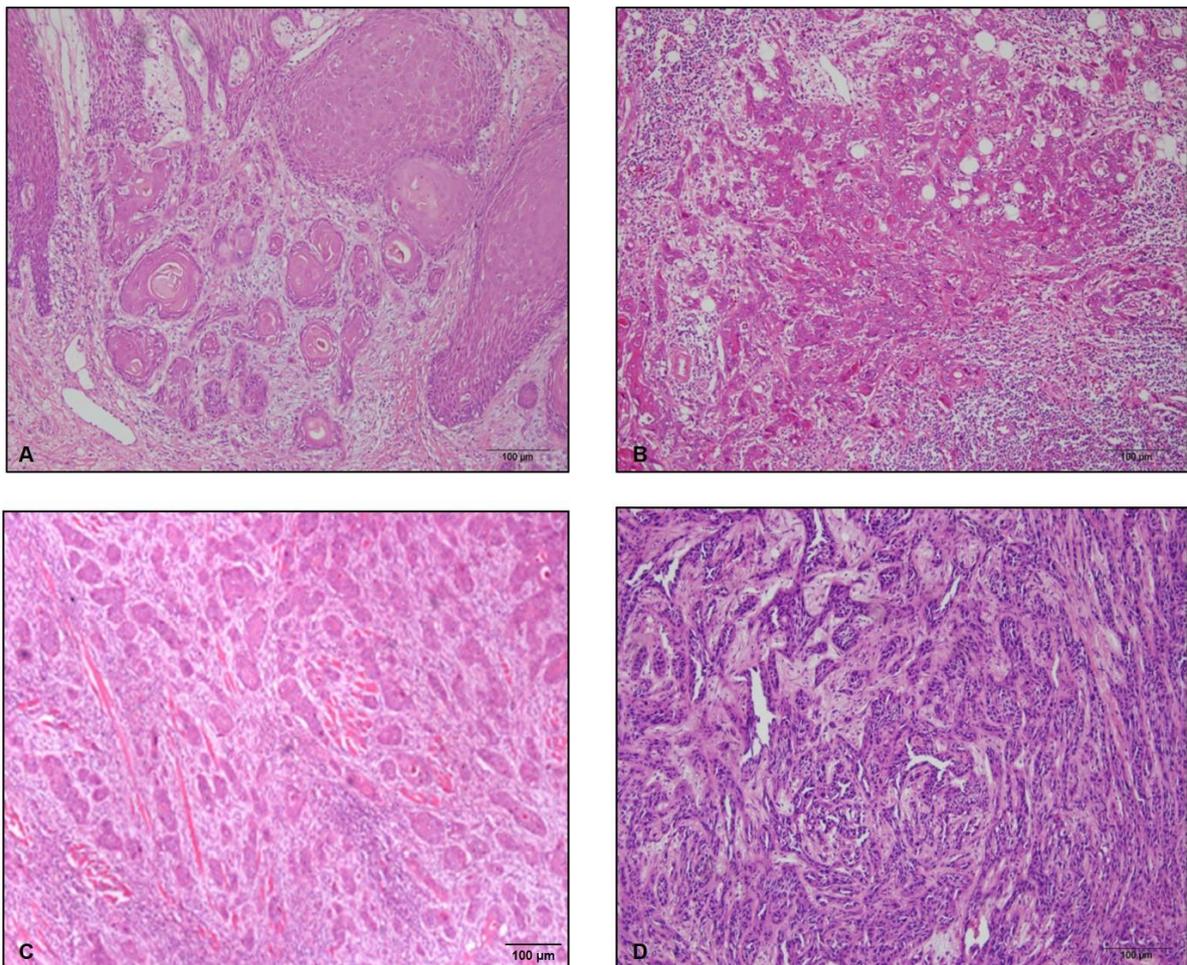


Figura 4.2: *Classificação descritiva de Broders.* **A** Grau 1; **B** Grau 2; **C** Grau 3; **D** Grau 4.

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA P16

A avaliação da imunoe expressão semi-quantitativa da proteína p16 em cada caso foi realizada de acordo com EVANS *et al.* (2013), onde foram classificados como positivos para HPV os casos com marcação de p16 nuclear e citoplasmática forte e difusa presente em mais de 70% das células malignas. Todos os outros padrões de marcação foram classificados como negativos (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Resultado imuno-histoquímico da proteína p16 nos tumores avaliados (n=346).

IMUNO-HISTOQUÍMICA		p16
Variável	Categoria	n (%)
Marcação	Negativa	314 (90,8%)
	Positiva	32 (9,2%)

Prevaleram os casos negativos para a expressão da proteína p16 (90,8%), apenas 9,2% dos CCEO foram positivos para p16 (Figura 4.3).

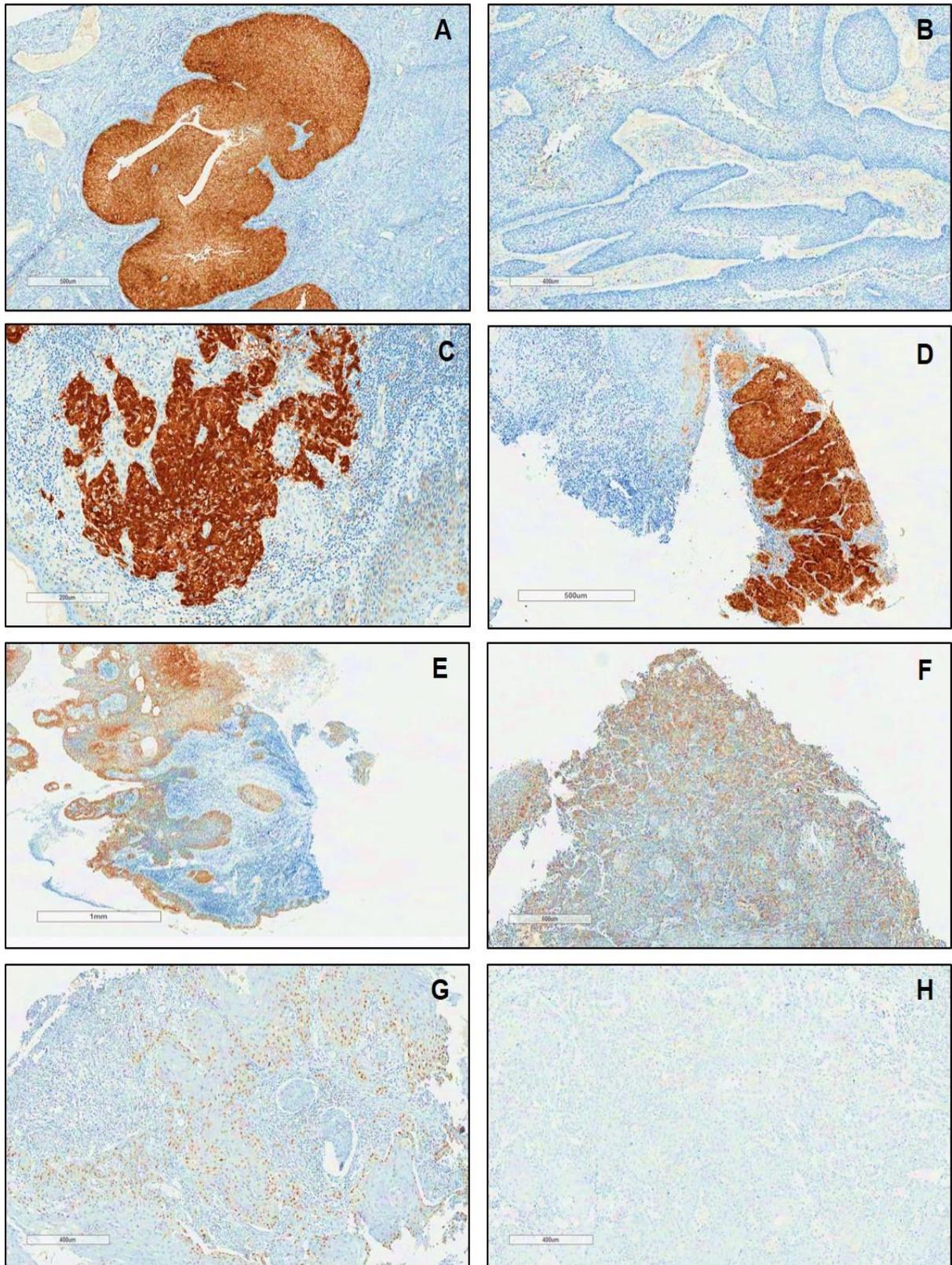


Figura 4.3: Fotomicrografias imuno-histoquímica do anticorpo p16. **A** Adenocarcinoma de colo do útero - controle positivo; **B** Adenocarcinoma de colo do útero - controle negativo; **C** e **D** CCEO positivos; **E** a **H** CCEO negativos.

4.4 MOLECULARES

Foi realizada a extração de DNA do tecido parafinado de todas as 346 amostras de CCEO, seguida da quantificação do DNA, onde a relação das densidades óticas, foi igual ou maior a 1,7 para todos os casos, demonstrando a pureza do material.

4.4.1 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE PARA β -ACTINA

A PCR foi utilizada para amplificar a região do DNA genômico correspondente ao gene β -actina (250 pb) para avaliação da viabilidade de amplificação de todas as amostras incluídas no estudo (**Figura 4.4**).

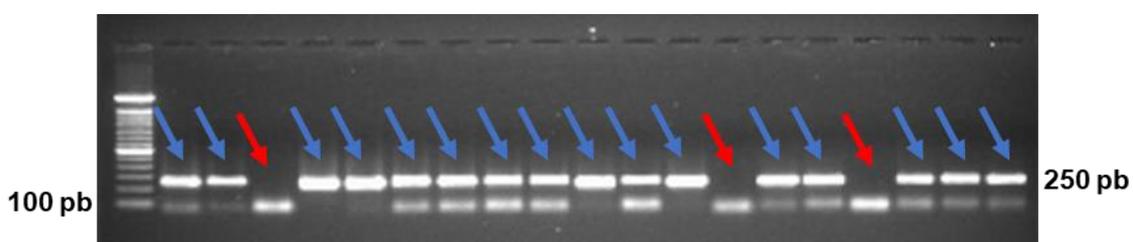


Figura 4.4: Foto de eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar a amplificação do fragmento do gene β -actina (250 pb). As bandas específicas presentes nas linhas 2-3, 5-13, 15-16 e 18-20 (setas azuis) são referentes à amplificação a partir de DNA extraído de material parafinado, já nas linhas 4, 14 e 17 (setas vermelhas) essa amplificação não ocorre.

Apenas 3,5% dos CCEO não amplificaram o gene β -actina, prevaleceram os casos que amplificaram esse gene (96,5%) (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.4: Resultado da reação de PCR do gene β -actina nos tumores avaliados (n=346).

PCR		<i>β-actina</i>
Variável	Categoria	n (%)
Amplificação	Negativa	11 (3,5%)
	Positiva	335 (96,5%)

4.4.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE QUANTITATIVA PARA *E6* HPV 16

A técnica de PCRq foi utilizada para avaliar a presença do DNA do HPV do tipo 16 a partir da amplificação do gene *E6* desse HPV nos 335 casos que apresentaram viabilidade de amplificação através da *β-actina*.

Foram considerados positivos para HPV os casos que apresentassem um Ct de amplificação igual ou inferior ao do controle positivo, a partir da mesma quantidade de DNA (25 ng). Todos os outros casos foram classificados como negativos (**Figura 4.5**).

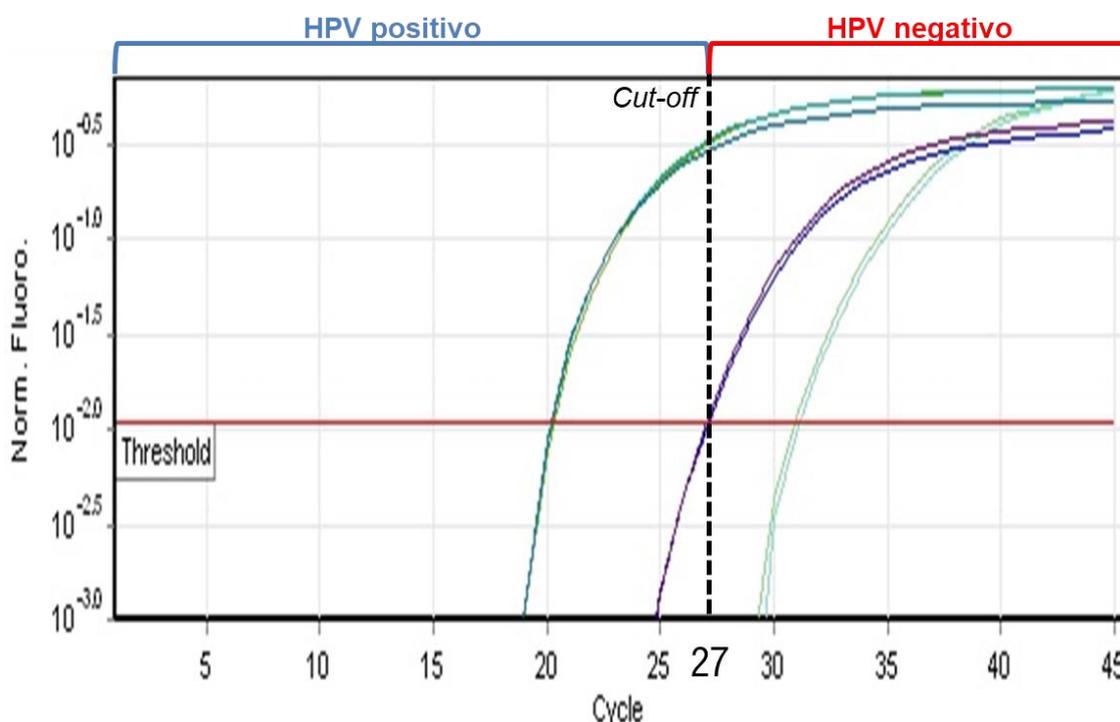


Figura 4.5: Foto da curva de amplificação do gene *E6* do HPV 16 (120 pb). Os casos que apresentaram Ct de amplificação igual ou inferior ao *cut-off* do controle positivo de adenocarcinoma de colo de útero (linha pontilhada) foram

consideradas positivas para o HPV 16 (colchete azul) e todos os casos que apresentaram Ct de amplificação maior que o *cut-off* foram classificados como HPV negativos (colchete vermelho).

Apenas 11,9% dos CCEO foram positivos para a presença do gene *E6* do HPV 16, prevaleceram os casos negativos para esse gene (88,1%) (**Tabela 4.5**).

Tabela 4.5: Resultado da reação de PCRq do gene *E6* do HPV 16 nos tumores avaliados ($n=335$).

PCRq		<i>E6</i> HPV 16
Variável	Categoria	n (%)
Presença	Negativa	295 (88,1%)
	Positiva	40 (11,9%)

4.5 STATUS DO HPV

O *status* do HPV foi estabelecido a partir da combinação dos resultados da imunexpressão da proteína p16 e da expressão do gene *E6* do HPV 16. Os casos positivos tanto para p16 quanto para *E6* foram considerados positivos para a infecção pelo HPV. Todos os outros padrões foram considerados negativos para a presença do HPV.

Predominaram os casos com *status* negativo para HPV (93,9%), apenas 6,1% dos CCEO foram classificados como *status* positivo para a infecção pelo HPV (**Tabela 4.6**). Informações detalhadas do perfil dos pacientes com CCEO HPV positivos está descrito no **Anexo 8.4**.

Tabela 4.6: Status de HPV nos tumores avaliados ($n=346$).

IHQ + PCRq		Status HPV
Variável	Categoria	n (%)
Status HPV	Negativo (p16+/- e <i>E6</i> - ou p16- e <i>E6</i> +/-)	325 (93,9%)
	Positivo (p16+ e <i>E6</i> +))	21 (6,1%)

Todos os onze casos que não foram submetidos ao PCRq para *E6* por não amplificarem *β-actina* foram classificados como negativos para a imunexpressão de p16, logo foram agrupados no *status* HPV negativo, independente do resultado da expressão de *E6*.

4.6 ANÁLISES EPIGENÉTICAS

Foi realizado tratamento com bissulfito de sódio em 346 amostras de CCEO, com o objetivo de transformar as citosinas não metiladas em uracila (as citosinas metiladas permanecem inalteradas).

4.6.1 PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL DE LINE-1

A amplificação de LINE-1 nos 346 casos de CCEO foi realizado por PCR convencional, onde os produtos das reações podem ser visualizados em gel de agarose 2% como ilustrado na **Figura 4.6**.

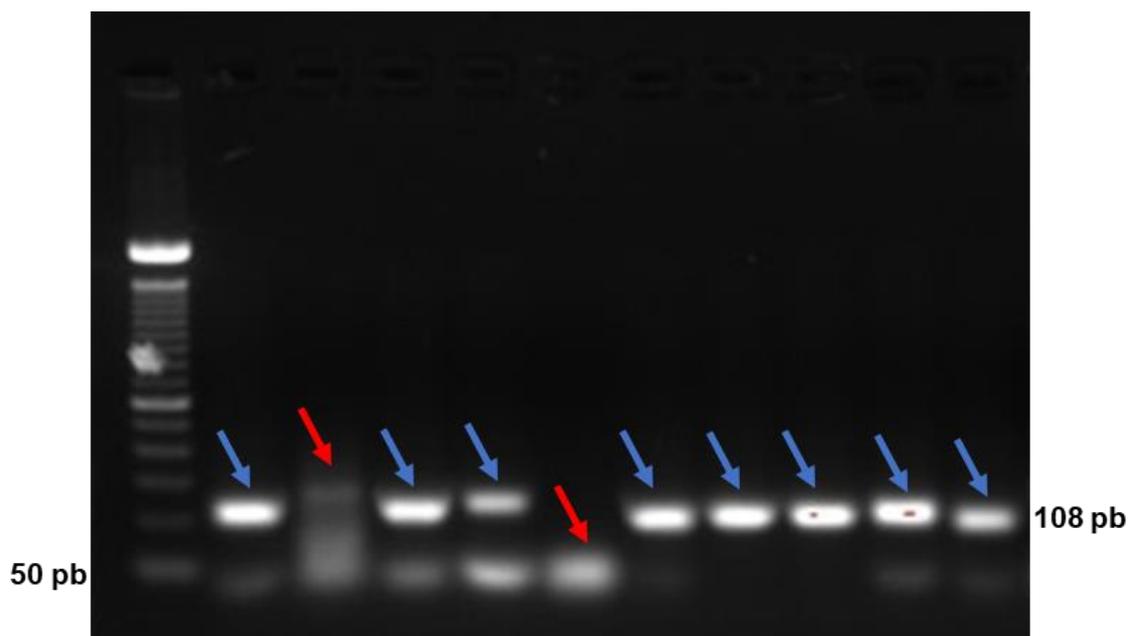


Figura 4.6: Foto de eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar a amplificação do fragmento do elemento transponível LINE-1 (108 pb). As bandas específicas presentes nas linhas 2, 4-5 e 7-11 (setas azuis) são referentes à amplificação a partir de DNA extraído de material parafinado submetido a conversão com bissulfito de sódio, já nas linhas 3, e 6 (setas vermelhas) essa amplificação não ocorre.

Os produtos de PCR de LINE-1 foram coletados para a análise da metilação de sítios CpG por pirosequenciamento. Os níveis de metilação de LINE-1 foram em grande parte heterogêneos (amplitude de 16,39-73,95% e mediana de 55,90%). O nível médio de metilação LINE-1 foi maior em pacientes com CCEO HPV positivos do que CCEO HPV negativos (**Tabela 4.7**).

Tabela 4.7: Perfil de metilação global de LINE-1 nos casos de CCEO (n=346).

PCR		LINE-1	
Variável	Categoria	Metilação média %	n (%)
Metilação	Hipometilado (HPV negativo)	52,95%	325 (93,9%)
	Hipermetilado (HPV positivo)	63,65%	21 (6,1%)

4.6.2 PERFIL DE METILAÇÃO PARA A ASSINATURA EPIGENÉTICA PADRÃO DA INFECÇÃO PELO HPV

A amplificação dos genes da assinatura epigenética padrão *HLTFAS1*, *FAM217B* e *B3GALT6* foi realizado por PCR convencional em 216 casos de CCEO, onde os produtos das reações podem ser visualizados em gel de agarose 2% como ilustrado na **Figura 4.7**.

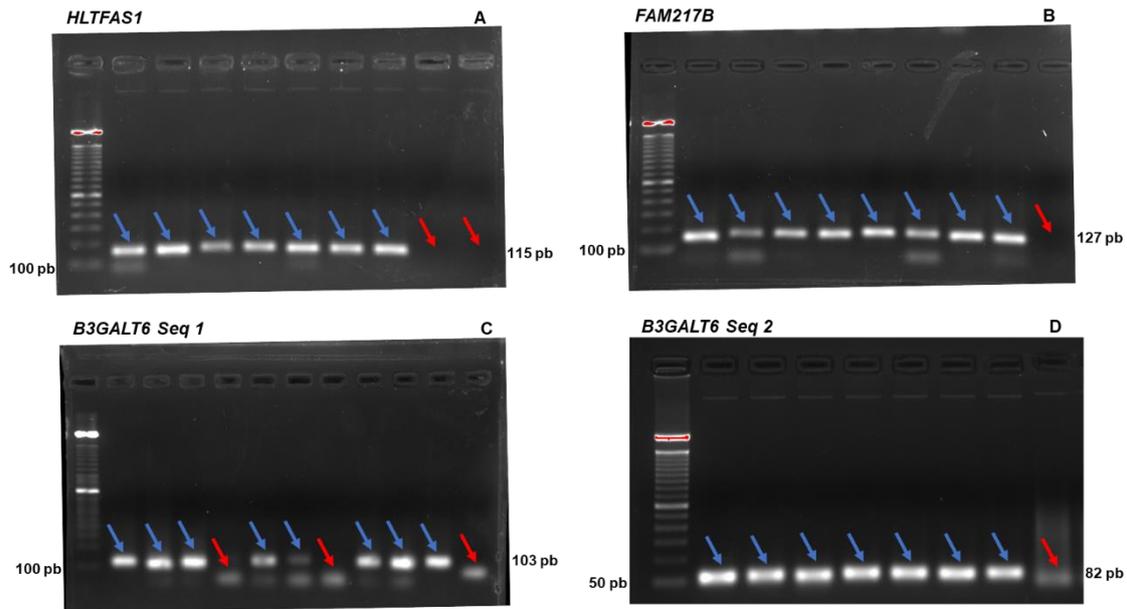


Figura 4.7: Foto de eletroforese em gel de agarose 2% para avaliar a amplificação do fragmento dos genes da assinatura epigenética padrão do HPV. **A** Gene *HLTFAS1* (115 pb): As bandas específicas presentes nas linhas 2-7 (setas azuis) são referentes à amplificação, já nas linhas 8-9 (setas vermelhas) essa amplificação não ocorre; **B** Gene *FAM217B* (127 pb): As bandas específicas presentes nas linhas 2-8 (setas azuis) são referentes à amplificação, já na linha 9 (seta vermelha) essa amplificação não ocorre; **C** Gene *B3GALT6 Sequência 1* (103 pb): As bandas específicas presentes nas linhas 2-4, 6-7 e 9-11 (setas azuis) são referentes à amplificação, já nas linhas 5, 8 e 12 (setas vermelhas) essa amplificação não ocorre; e **D** Gene *B3GALT6 Sequência 2* (82 pb): As bandas específicas presentes nas linhas 2-7 (setas azuis) são referentes à amplificação, já na linha 8 (seta vermelha) essa amplificação não ocorre.

Os produtos de PCR dos genes da assinatura epigenética do HPV foram coletados para a análise da metilação de cinco sítios CpG por pirosequenciamento. Os níveis de metilação de assinatura epigenética padrão foram em grande parte heterogêneos (amplitude de 29,27-96,82% e mediana de 79,51%). Utilizando o corte correspondente ao percentual de 75% de metilação, foram classificados como HPV positivos 84 (38,9%) casos e como HPV negativos 132 (61,1%) casos (**Tabela 4.8**).

Tabela 4.8: Perfil de metilação da assinatura epigenética do HPV nos casos de CCEO ($n=216$).

PCR		ASSINATURA EPIGENÉTICA PADRÃO	
Variável	Categoria	Metilação média %	n (%)
HPV	Negativo	78,07%	132 (61,1%)
	Positivo	62,62%	84 (38,9%)

4.7 COMPARAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES COM OS DESFECHOS ESTUDADOS

4.7.1 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO AO ESTADIAMENTO CLÍNICO

Os indivíduos com estadiamento clínico avançado apresentaram-se, em sua maioria, como tabagistas e ex-tabagistas ($p=0,013$), com tumores de sítio único ($p=0,023$), com intenção de tratamento paliativa ($p<0,0001$), sem progressão da doença ($p=0,022$) ou recidiva ($p=0,008$). Ao final do estudo, maioria daqueles com estadiamento clínico avançado foi à óbito ($p=0,001$), sendo este decorrente de complicações do câncer ($p=0,004$). Para a IHQ para p16, PCRq para E6, *status* de HPV, metilação de LINE-1 ou assinatura epigenética padrão do HPV não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (**Tabela 4.9**).

Tabela 4.9: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação ao estadiamento clínico ($n=346$).

VARIÁVEL	CATEGORIA	ESTADIAMENTO CLÍNICO		
		Inicial I/II n (%)	Avançado III/IV n (%)	<i>p</i>
Tabagismo	Sim e ex	69 (19,9%)	258 (74,6%)	0,013
	Não	-	19 (5,5%)	
Sítios Tumorais	Único sítio	40 (11,6%)	198 (57,2%)	0,023
	Dois ou mais sítios	29 (8,4%)	79 (22,8%)	

Intenção do Tratamento Inicial	Curativa	59 (17,1%)	129 (37,3%)	<0,0001
	Paliativa	10 (2,9%)	148 (42,8%)	
Progressão da Doença	Sim	10 (2,9%)	74 (21,4%)	0,022
	Não	59 (17,1%)	203 (58,7%)	
Recidiva	Sim	30 (8,7%)	76 (22%)	0,008
	Não	39 (11,2%)	201 (58,1%)	
Óbito	Sim	44 (12,7%)	227 (65,6%)	0,001
	Não	25 (7,2%)	50 (14,5%)	
Óbito por Câncer	Sim	39 (14,8%)	217 (82,2%)	0,004
	Não	5 (1,9%)	3 (1,1%)	
p16	Positivo	6 (1,7%)	26 (7,5%)	0,537
	Negativo	63 (18,2%)	251 (72,5%)	
E6	Positivo	8 (2,4%)	32 (9,6%)	0,575
	Negativo	60 (17,9%)	235 (70,1%)	
Status HPV	Positivo	2 (0,6%)	19 (5,5%)	0,172
	Negativo	67 (19,4%)	258 (74,6%)	
Metilação de LINE-1	Hipermetilado	34 (9,8%)	139 (40,2%)	0,500
	Hipometilado	35 (10,1%)	138 (39,9%)	
Assinatura Epigenética Padrão	Positivo	20 (9,3%)	64 (29,6%)	0,290
	Negativo	26 (12%)	106 (49,1%)	

4.7.2 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO À IMUNOEXPRESSÃO DE P16

A maioria dos indivíduos com imunoposição negativa para p16 foram de cor da pele não branca ($p=0,028$), apresentaram ausência de E6 do HPV 16 ($p<0,0001$), status de HPV negativo ($p<0,0001$), hipometilação de LINE-1 ($p=0,020$) e assinatura epigenética padrão negativa para HPV ($p<0,0001$) (Tabela 4.10).

Tabela 4.10: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação à imunoposição de p16 ($n=346$).

VARIÁVEL	CATEGORIA	p16		p
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Cor da Pele	Branca	145 (41,9%)	21 (6,1%)	0,028
	Não branca	169 (48,8%)	11 (3,2%)	
Recidiva	Sim	92 (26,6%)	14 (4%)	0,071
	Não	222 (64,2%)	18 (5,2%)	
E6	Positivo	19 (5,7%)	21 (6,3%)	<0,0001
	Negativo	284 (84,8%)	11 (3,3%)	
Status HPV	Positivo	-	21 (6,1%)	<0,0001
	Negativo	314 (90,8%)	11 (3,2%)	
Metilação de LINE-1	Hipermetilado	151 (43,6%)	22 (6,4%)	0,020
	Hipometilado	163 (47,1%)	10 (2,9%)	
Assinatura Epigenética Padrão	Positivo	62 (28,7%)	22 (10,2%)	<0,0001
	Negativo	122 (56,5%)	10 (4,6%)	

4.7.3 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO À PRESENÇA DE E6 DO HPV 16

Quanto à ausência de E6, a maioria dos pacientes apresentou imunoeexpressão negativa de p16 ($p < 0,0001$), status de HPV negativo ($p < 0,0001$), hipometilação de LINE-1 ($p = 0,033$) e assinatura epigenética padrão negativa do HPV ($p < 0,0001$) (Tabela 4.11).

Tabela 4.11: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação à presença de E6 ($n=335$).

VARIÁVEL	CATEGORIA	E6		p
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
p16	Positivo	11 (3,3%)	21 (6,3%)	<0,0001
	Negativo	284 (84,8%)	19 (5,7%)	
Status HPV	Positivo	-	21 (6,3%)	<0,0001
	Negativo	295 (88,1%)	19 (5,7%)	
Metilação de LINE-1	Hipermetilado	142 (42,4%)	26 (7,8%)	0,033
	Hipometilado	153 (45,7%)	14 (4,2%)	
Assinatura Epigenética Padrão	Positivo	54 (25,6%)	30 (14,2%)	<0,0001
	Negativo	117 (55,5%)	10 (4,7%)	

4.7.4 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO AO STATUS DE HPV

A maioria dos casos com status negativo para HPV apresentou imunoeexpressão negativa de p16 ($p < 0,0001$), ausência de E6 ($p < 0,0001$), hipometilação de LINE-1 ($p < 0,0001$) e assinatura epigenética padrão negativa do HPV ($p < 0,0001$) (Tabela 4.12).

Tabela 4.12: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação ao status de HPV ($n=346$).

VARIÁVEL	CATEGORIA	Status de HPV		p
		Negativo n (%)	Positivo n (%)	
Escolaridade	Analfabeto	37 (10,7%)	5 (1,4%)	0,066

	Básico	241 (69,7%)	13 (3,8%)	
	Médio	39 (11,3%)	1 (0,3%)	
	Superior	8 (2,3%)	2 (0,6%)	
p16	Positivo	11 (3,1%)	21 (6,1%)	<0,0001
	Negativo	314 (90,8%)	-	
E6	Positivo	19 (5,7%)	21 (6,3%)	<0,0001
	Negativo	295 (88,1%)	-	
Metilação de LINE-1	Hipermetilado	-	20 (8%)	<0,0001
	Hipometilado	231 (92%)	-	
Assinatura Epigenética Padrão	Positivo	67 (31%)	17 (7,9%)	<0,0001
	Negativo	128 (59,3%)	4 (1,9%)	

4.7.5 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO À METILAÇÃO DE LINE-1

Em relação à metilação de LINE-1, a maioria dos indivíduos com hipermetilação foi do sexo masculino ($p=0,012$), etilista ($p=0,004$) e que vieram a óbito ($p=0,034$). Já os casos com hipometilação de LINE-1, apresentaram baixa escolaridade ($p=0,011$), imunexpressão negativa de p16 ($p=0,020$), ausência de E6 ($p=0,033$), status de HPV negativo ($p=0,001$) e assinatura epigenética padrão negativa do HPV ($p=0,002$) (Tabela 4.13).

Tabela 4.13: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação a metilação mediana de LINE-1 ($n=346$).

VARIÁVEL	CATEGORIA	METILAÇÃO MEDIANA DE LINE-1		<i>p</i>
		Hipometilado ≤55,90% n (%)	Hipermetilado >55,90% n (%)	
Sexo	Masculino	147 (42,5%)	161 (46,5%)	0,012
	Feminino	26 (7,5%)	12 (3,5%)	
Escolaridade	Baixa (≤8 anos)	156 (45,1%)	140 (40,5%)	0,011
	Alta (> 8 anos)	17 (4,9%)	33 (9,5%)	
Etilismo	Sim, social e ex	144 (41,6%)	161 (46,5%)	0,004
	Não	29 (8,4%)	12 (3,5%)	
Óbito	Sim	128 (37%)	143 (41,3%)	0,034
	Não	45 (13%)	30 (8,7%)	
p16	Positivo	10 (2,9%)	22 (6,4%)	0,020
	Negativo	163 (47,1%)	151 (43,6%)	
E6	Positivo	14 (4,2%)	26 (7,8%)	0,033
	Negativo	153 (45,7%)	142 (42,4%)	
Status HPV	Positivo	3 (0,9%)	18 (5,2%)	0,001
	Negativo	170 (49,1%)	155 (44,8%)	
Assinatura Epigenética Padrão	Positivo	33 (15,3%)	51 (23,6%)	0,002
	Negativo	79 (36,6%)	53 (24,5%)	

O nível de metilação LINE-1 em pacientes com CCEO positivos para HPV foi maior do que em CCEO HPV negativos ($p < 0,0001$) (**Figura 4.8**).

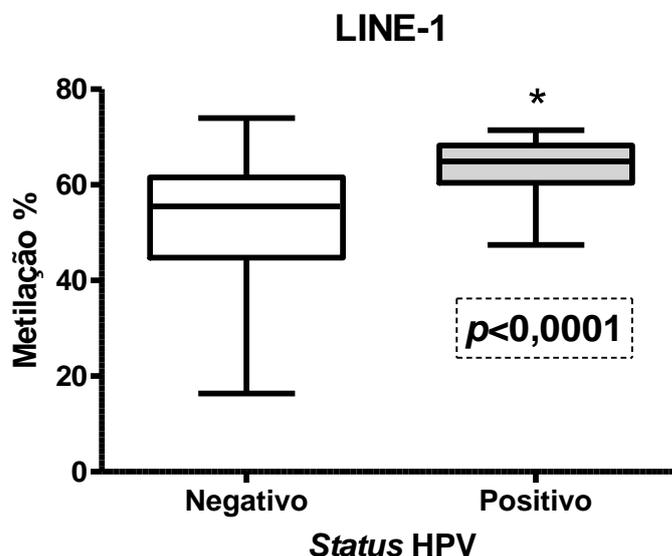


Figura 4.8: Índice cumulativo de metilação de LINE-1 em CCEO negativo para HPV (52,95%; $n=325$) e CCEO positivo para HPV (63,65%; $n=21$) representado no gráfico de boxplot ($p < 0,0001$) ($n=346$).

A análise da Curva ROC comparando o padrão de metilação de LINE-1 no CCEO HPV positivo (63,65%; $n=21$) e CCEO HPV negativo (52,95%; $n=325$) apresentou AUC de 0,80, sensibilidade de 85,66% e especificidade de 66,77%, utilizando como ponto de corte ideal 59,58% ($p < 0,0001$) (**Figura 4.9**).

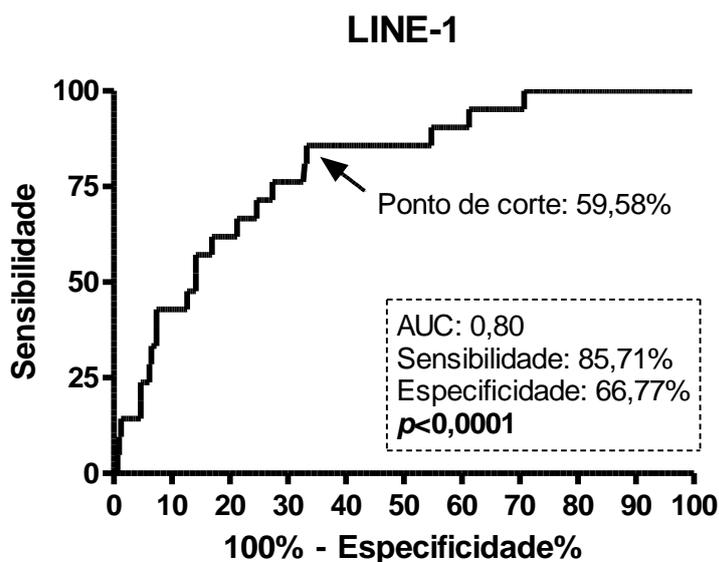


Figura 4.9: Análise da curva ROC da metilação de LINE-1 em CCEO. O padrão de metilação de LINE-1 comparando CCEO HPV positivo (63,65%; n=21) e CCEO HPV negativo (52,95%; n=325) com um ponto de corte de 59,58% ($p < 0,0001$) (n=346).

4.7.6 VARIÁVEIS SOCIODEMOGRÁFICAS, CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES EM RELAÇÃO À ASSINATURA EPIGENÉTICA DO HPV

Para a assinatura epigenética padrão negativa do HPV a maioria dos pacientes não apresentou progressão da doença ($p = 0,008$), teve a imunexpressão negativa de p16 ($p < 0,0001$), ausência de E6 ($p = 0,031$), status de HPV negativo ($p < 0,0001$) e hipometilação de LINE-1 ($p = 0,002$) (Tabela 4.14).

Tabela 4.14: Frequências absolutas e relativas das variáveis independentes em relação a assinatura epigenética do HPV (n=216).

VARIÁVEL	CATEGORIA	Assinatura Epigenética Padrão do HPV		p
		Negativa n (%)	Positiva n (%)	
Progressão da doença	Sim	25 (11,6%)	29 (13,4%)	0,008
	Não	107 (49,5%)	55 (25,5%)	
p16	Positivo	10 (4,6%)	22 (10,2%)	<0,0001
	Negativo	122 (56,5%)	62 (28,7%)	

E6	Positivo	10 (4,7%)	30 (14,2%)	<0,0001
	Negativo	117 (55,5%)	54 (25,6%)	
Status HPV	Positivo	4 (1,9%)	17 (7,9%)	<0,0001
	Negativo	128 (59,3%)	67 (31%)	
Metilação de LINE-1	Hipermetilado	53 (24,5%)	51 (23,6%)	0,002
	Hipometilado	79 (36,6%)	33 (15,3%)	

O nível de metilação da assinatura epigenética padrão do HPV foi menor em pacientes com CCEO positivos para HPV em relação àqueles com CCEO HPV negativos ($p < 0,0001$) (**Figura 4.10**).

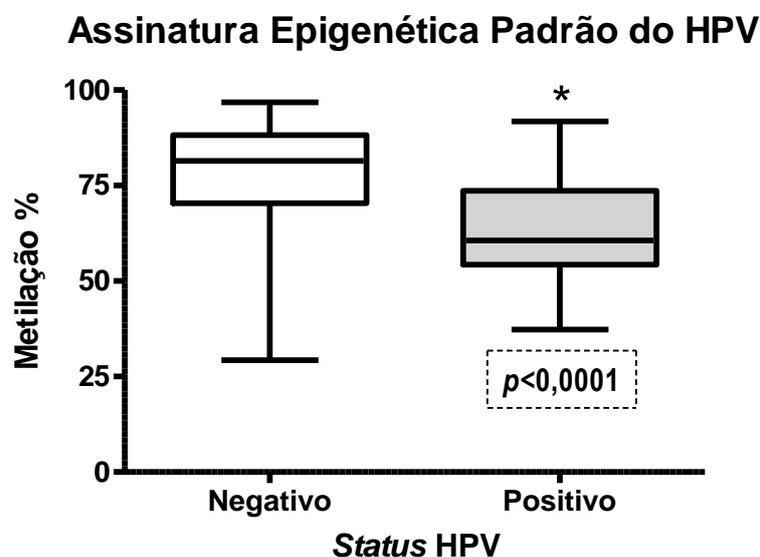


Figura 4.10: Índice cumulativo de metilação da assinatura epigenética padrão do HPV em CCEO negativo para HPV (78,07%; $n=195$) e CCEO positivo para HPV (62,62%; $n=21$) representado no gráfico de boxplot ($p < 0,0001$) ($n=216$).

A análise da Curva ROC comparando o padrão de metilação da assinatura epigenética do HPV no CCEO HPV positivo (62,62%; $n=21$) e CCEO HPV negativo (78,07%; $n=195$) apresentou AUC de 0,78, sensibilidade de 71,43% e especificidade de 78,46%, utilizando como ponto de corte ideal 68,92% ($p < 0,0001$) (**Figura 4.11**).

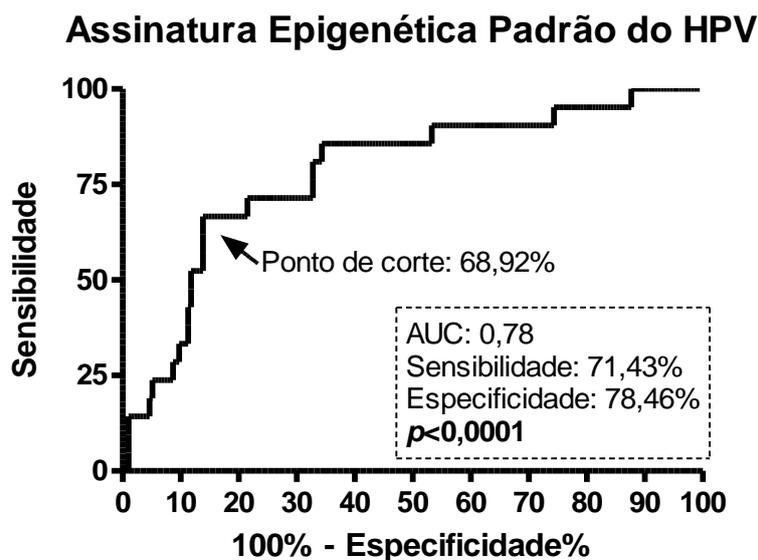


Figura 4.11: Análise da curva ROC da assinatura epigenética padrão do HPV em CCEO. O padrão de metilação da assinatura epigenética do HPV comparando CCEO HPV positivo (62,62%; n=21) e CCEO HPV negativo (78,07%; n=195) com um ponto de corte de 68,92% ($p < 0,0001$) (n=216).

Com o intuito de obter uma assinatura epigenética com maior valor preditivo para a população do estudo, avaliamos isoladamente os cinco sítios CpG dos genes da assinatura epigenética padrão do HPV e observamos o perfil da metilação dos genes em relação ao *status* HPV (**Tabela 4.15**). Os indivíduos *status* negativo para HPV apresentaram-se, em sua maioria, hipermetilação dos sítios CpG de interesse (94,90% - *HLTFAS1*; 62,56% - *FAM217B*; 86,78% - *B3GALT6* Sequência 1; 77% - *B3GALT6* Sequência 2-5; e 98,35% - *B3GALT6* Sequência 2-7) em relação aos pacientes positivos para HPV (59,98% - *HLTFAS1*; 51,47% - *FAM217B*; 64,88% - *B3GALT6* Sequência 1; 63,47% - *B3GALT6* Sequência 2-5; e 81,43% - *B3GALT6* Sequência 2-7).

Tabela 4.15: Frequências absolutas e relativas dos genes da assinatura epigenética padrão em relação ao *status* de HPV (n=216).

VARIÁVEL	CATEGORIA	Status de HPV		p
		Positivo n (%)	Negativo n (%)	
<i>HLTFAS1</i>	Positivo	15 (6,9%)	18 (8,3%)	<0,0001
	Negativo	6 (2,8%)	177 (81,9%)	

FAM217B	Positivo	14 (6,5%)	66 (30,6%)	0,0028
	Negativo	7 (3,2%)	129 (59,7%)	
B3GALT6 Sequência 1	Positivo	14 (6,5%)	32 (14,8%)	<0,0001
	Negativo	7 (3,2%)	163 (75,5%)	
B3GALT6 Sequência 2 (5)	Positivo	14 (6,5%)	89 (41,2%)	0,0539
	Negativo	7 (3,2%)	106 (49,1%)	
B3GALT6 Sequência 2 (7)	Positivo	16 (7,4%)	64 (29,6%)	0,0124
	Negativo	5 (2,3%)	131 (60,6%)	

Inicialmente estabelecemos um modelo com os quatro sítios CpG – *HLTFAS1*; *FAM217B*; *B3GALT6* Sequência 1; e *B3GALT6* Sequência 2-7 – que apresentaram significância frente ao *status* de HPV estabelecido. O nível de metilação do modelo de assinatura epigenética do HPV com quatro sítios CpG foi menor em pacientes com CCEO positivos para HPV em relação àqueles com CCEO HPV negativos ($p < 0,0001$) (**Figura 4.12**).

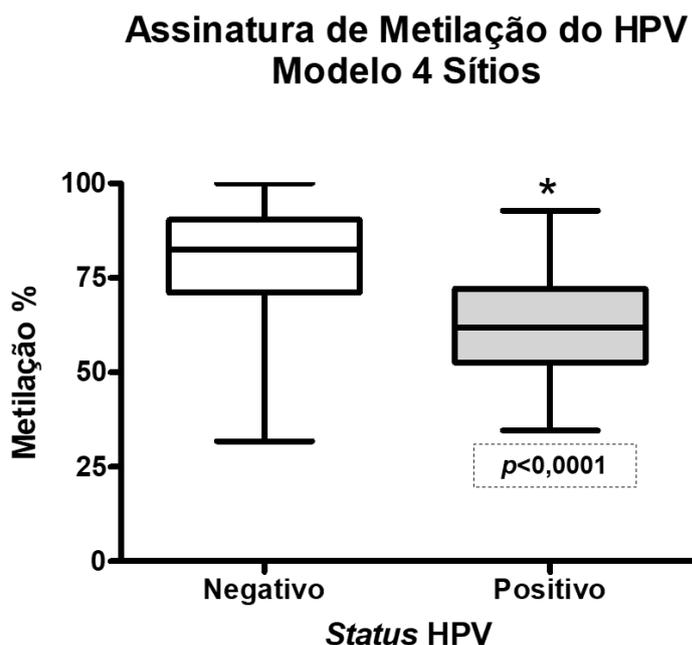


Figura 4.12: Índice cumulativo de metilação do modelo com os quatro sítios CpG para assinatura epigenética do HPV em CCEO negativo para HPV (82,60%; $n=195$) e CCEO positivo para HPV (61,77%; $n=21$) representado no gráfico de boxplot ($p < 0,0001$) ($n=216$).

A análise da Curva ROC comparando o padrão de metilação da assinatura epigenética do HPV com quatro sítios no CCEO HPV positivo (61,77%; n=21) e CCEO HPV negativo (82,60%; n=195) apresentou AUC de 0,81, sensibilidade de 71,28% e especificidade de 71,28%, utilizando como ponto de corte ideal 72,70% ($p < 0,0001$) (**Figura 4.13**).

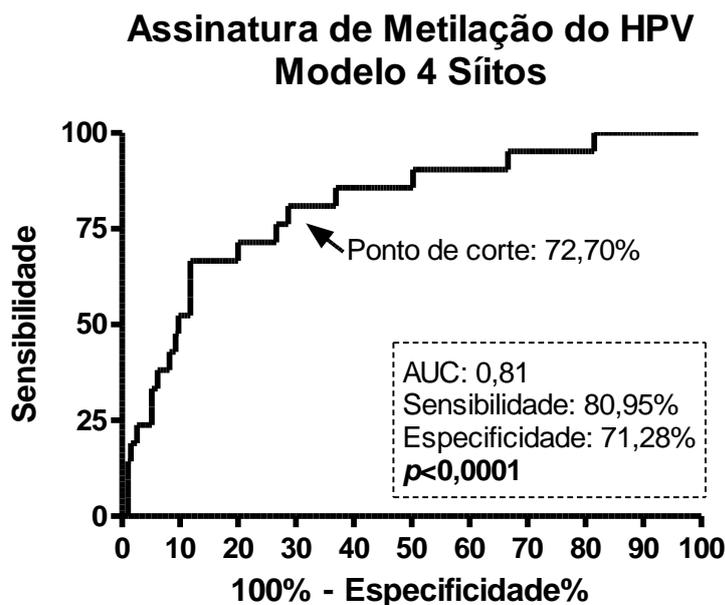


Figura 4.13: Análise da curva ROC do modelo com os quatro sítios CpG da assinatura epigenética do HPV em CCEO. O padrão de metilação do modelo com os quatro sítios CpG para a assinatura epigenética do HPV comparando CCEO HPV positivo (61,77%; n=21) e CCEO HPV negativo (82,60%; n=195) com um ponto de corte de 72,70% ($p < 0,0001$) (n=216).

Diante do resultado, optamos por estabelecer um modelo com apenas dois sítios CpG – *HLTFAS1*; e *B3GALT6* Sequência 1 – que apresentaram um p -valor $< 0,001$ frente ao *status* de HPV estabelecido. O nível de metilação do modelo de assinatura epigenética do HPV com dois sítios CpG foi menor em pacientes com CCEO positivos para HPV em relação àqueles com CCEO HPV negativos ($p < 0,0001$) (**Figura 4.14**).

Assinatura de Metilação do HPV Modelo 2 Sítios

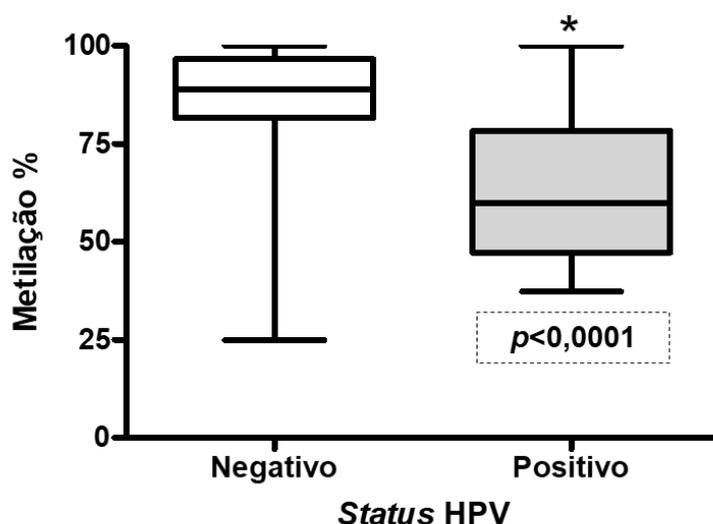


Figura 4.14: Índice cumulativo de metilação do modelo com os dois sítios CpG para assinatura epigenética do HPV em CCEO negativo para HPV (89,07%; $n=195$) e CCEO positivo para HPV (60,04%; $n=21$) representado no gráfico de boxplot ($p<0,0001$) ($n=216$).

A análise da Curva ROC comparando o padrão de metilação da assinatura epigenética do HPV com dois sítios no CCEO HPV positivo (60,04%; $n=21$) e CCEO HPV negativo (89,07%; $n=195$) apresentou AUC de 0,80, sensibilidade de 76,19% e especificidade de 84,1%, utilizando como ponto de corte ideal 74,6% ($p<0,0001$) (**Figura 4.15**).

Assinatura de Metilação do HPV Modelo 2 Sítios

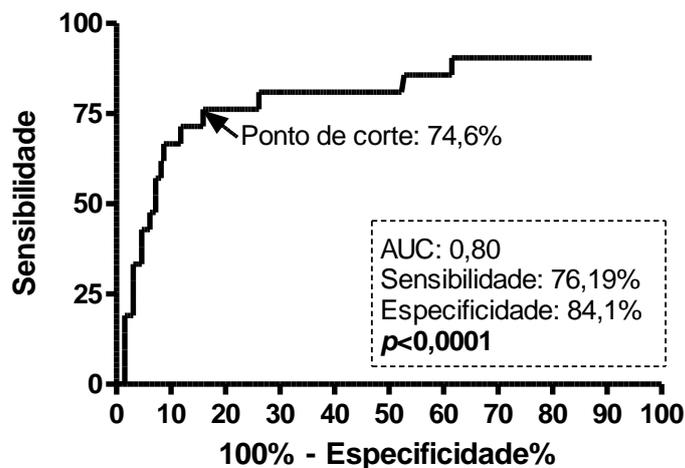


Figura 4.15: Análise da curva ROC do modelo com os dois sítios CpG da assinatura epigenética do HPV em CCEO. O padrão de metilação do modelo com os dois sítios CpG para a assinatura epigenética do HPV comparando CCEO HPV positivo (60,04%; n=21) e CCEO HPV negativo (89,07%; n=195) com um ponto de corte de 74,6% ($p < 0,0001$) (n=216).

Informações dos casos positivos para HPV frente as diferentes técnicas utilizadas estão descritas no **Anexo 8.5**.

4.8 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.8.1 SOBREVIDA GLOBAL

A sobrevida global média dos pacientes foi de 20,79 meses, mínimo de 1,03 meses e máximo de 200 meses (mediana 10,75 meses e [IC 95% 9,96-14,57]).

Pacientes tabagistas ($p=0,004$), etilistas ($p=0,017$), com tumores que acometeram dois ou mais sítios ($p=0,046$), submetidos a tratamento com intenção paliativa ($p < 0,0001$), sem terapia adjuvante ($p=0,003$), em

estadiamento clínico avançado ($p < 0,0001$) e com tumores bem diferenciados ($p = 0,012$), apresentaram uma sobrevida global menor (**Figura 4.16**).

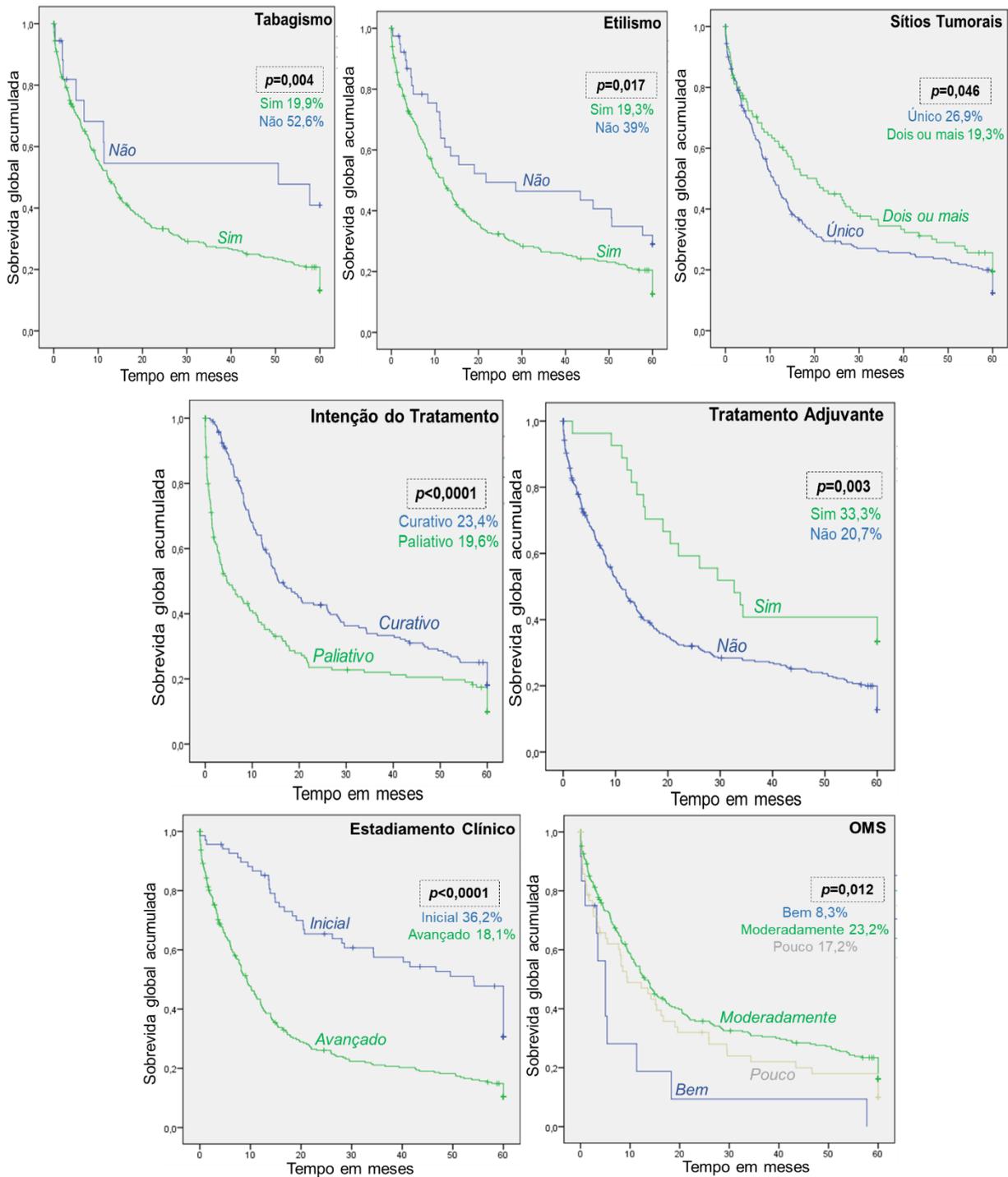


Figura 4.16: Curvas de sobrevida global da população com CCEO pelo método Kaplan-Meier em função das características sociodemográficas e clínico-patológicas. São apresentadas as respectivas taxas de sobrevida média global para as variáveis tabagismo, etilismo, sítios tumorais, intenção de

tratamento, tratamento adjuvante, estadiamento clínico e gradação histopatológica da OMS, aos 60 meses de seguimento com respectivos p valor.

Logo, a análise univariada de Cox ressaltou as variáveis tabagismo, etilismo, sítios tumorais, intenção do tratamento, tratamento adjuvante, estadiamento clínico e gradação histopatológica da OMS como fatores de risco para a ocorrência de óbito no CCEO (**Tabela 4.16**).

Após a regressão univariada de Cox, as variáveis incluídas no modelo múltiplo foram ajustadas por estadiamento clínico e idade, onde etilismo (HR=1,74 [IC 95% 1,15-2,63] $p=0,009$), intenção de tratamento (HR=1,38 [IC 95% 1,08-1,78] $p=0,011$) e tratamento adjuvante (HR=1,84 [IC 95% 1,13-3,05] $p=0,015$) permaneceram no modelo, como variáveis de valor independente na análise da sobrevida global (**Tabela 4.16**).

Tabela 4.16: Análise da sobrevida global: Avaliação do risco de ocorrência de óbito no CCEO em função das características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares.

SOBREVIDA GLOBAL		Univariada		Múltipla*	
VARIÁVEL	CATEGORIA	HR (95% IC)	p	HR (95% IC)	p
Sexo	Feminino	Referência		Referência	-
	Masculino	1,36 (0,93-2,0)	0,119	-	-
Tabagismo	Não	Referência		Referência	-
	Sim e ex	1,96 (1,01-3,82)	0,004	-	-
Etilismo	Não	Referência		Referência	0,009
	Sim, social e ex	1,65 (1,09-2,49)	0,017	1,74 (1,15-2,63)	
Sítios Tumorais	Único sítio	Referência		Referência	-
	Dois ou mais sítios	1,31 (1,00-1,70)	0,046	-	-
Intenção do Tratamento	Curativo	Referência		Referência	0,011
	Paliativo	1,74 (1,37-2,20)	<0,0001	1,38 (1,08-1,78)	
Tratamento Adjuvante	Sim	Referência		Referência	0,015
	Não	2,06 (1,27-3,32)	0,003	1,84 (1,13-3,05)	
Estadiamento Clínico	Inicial	Referência		Referência	-
	Avançado	2,49 (1,79-3,45)	<0,0001	-	-
Gradação Histopatológica (OMS)	Bem diferenciado	Referência		Referência	-
	Moderadamente diferenciado	0,43 (0,24-0,80)	0,007	-	-
	Pouco diferenciado	0,54 (0,28-1,04)	0,064	-	-
p16	Negativo	Referência		Referência	-
	Positivo	0,99 (0,66-1,50)	0,964	-	-
E6	Negativo	Referência		Referência	-
	Positivo	1,08 (0,74-1,56)	0,682	-	-
Status HPV	Negativo	Referência		Referência	-
	Positivo	1,15(0,71-1,86)	0,556	-	-

Metilação Mediana de LINE-1	Hipometilado ($\leq 55,90$)	Referência	<u>0,083</u>	Referência	-
	Hipermetilado ($> 55,90$)	1,23 (0,97-1,56)		-	-
Assinatura Epigenética Padrão	Negativo	Referência	<u>0,072</u>	Referência	-
	Positivo	1,32 (0,97-1,80)		-	-
Assinatura Epigenética 4 CpG	Negativo	Referência	0,672	Referência	-
	Positivo	1,07 (0,78-1,47)		-	-
Assinatura Epigenética 2 CpG	Negativo	Referência	0,903	Referência	-
	Positivo	1,02 (0,70-1,47)		-	-

*Ajustada por estadiamento clínico e idade.

4.8.2 SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA

A sobrevida livre de doença média dos pacientes foi de 17,60 meses, mínimo de 1,67 meses e máximo de 180 meses (mediana 8,17 meses e [IC 95% 4,33-11,72]).

Pacientes tabagistas ($p=0,038$), em estadiamento clínico avançado ($p<0,0001$), que não realizaram terapia adjuvante ($p=0,005$) e com assinatura epigenética padrão positiva para HPV ($p=0,041$), apresentaram uma sobrevida livre de doença menor (**Figura 4.17**).

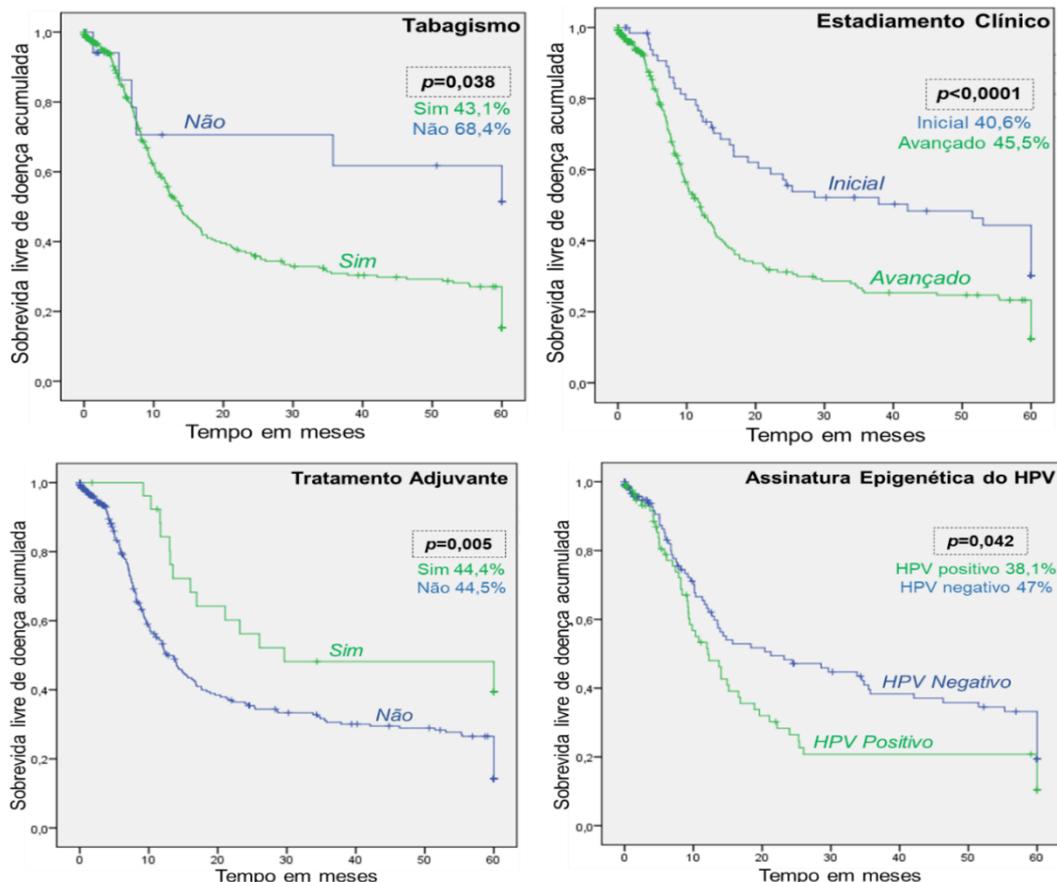


Figura 4.17: *Curvas de sobrevida livre de doença da população com CCEO pelo método Kaplan-Meier em função das características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares.* São apresentadas as respectivas taxas de sobrevida média livre de doença para as variáveis tabagismo, estadiamento clínico, tratamento adjuvante e assinatura epigenética padrão do HPV, aos 60 meses de seguimento com respectivos *p* valor.

A análise univariada de Cox ressaltou as variáveis tabagismo, estadiamento clínico, tratamento adjuvante e assinatura epigenética padrão do HPV como fatores de risco para a ocorrência de recidiva no CCEO (**Tabela 4.17**).

No modelo múltiplo de Cox, após ajuste por estadiamento clínico e idade, apenas a variável tratamento adjuvante (HR=2,15 [IC 95% 1,25-3,68] *p*=0,005) permaneceu no modelo. Neste caso, o risco de recidiva locorregional ou metástase à distância foi 2,15 vezes maior para quem não realizou esta modalidade terapêutica em relação a quem realizou (**Tabela 4.17**).

Tabela 4.17: *Análise da sobrevida livre de doença: Avaliação do risco de ocorrência de recidiva no CCEO em função das características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares.*

SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA		Univariada		Múltipla*	
VARIÁVEL	CATEGORIA	HR (IC)	<i>p</i>	HR (IC)	<i>p</i>
Tabagismo	Não	Referência	0,038	Referência	-
	Sim e ex	2,36 (1,04-5,34)		-	
Etilismo	Não	Referência	0,070	Referência	-
	Sim, social e ex	1,53 (0,96-2,44)		-	
Sítios Tumorais	Único sítio	Referência	0,059	Referência	-
	Dois ou mais sítios	1,34 (0,98-1,83)		-	
Tratamento Adjuvante	Sim	Referência	0,005	Referência	0,005
	Não	2,12 (1,25-3,59)		2,15 (1,25-3,68)	
Estadiamento Clínico	Inicial	Referência	<0,0001	Referência	-
	Avançado	1,91 (1,35-2,70)		-	
Gradação Histopatológica (OMS)	Bem diferenciado	Referência	0,085	Referência	-
	Moderadamente diferenciado	0,46 (0,19-1,12)		-	
	Pouco diferenciado	0,53 (0,20-1,36)		0,184	
p16	Negativo	Referência	0,211	Referência	-
	Positivo	1,32 (0,85-2,05)		-	
E6	Negativo	Referência	0,631	Referência	-

	Positivo	1,10 (0,72-1,69)		-	
Status HPV	Negativo	Referência		Referência	
	Positivo	1,34 (0,79-2,29)	0,268	-	-
Metilação Mediana de LINE-1	Hipometilado ($\leq 55,90$)	Referência		Referência	
	Hipermetilado ($> 55,90$)	0,97 (0,73-1,30)	0,878	-	-
Assinatura Epigenética Padrão	Negativo	Referência		Referência	
	Positivo	1,45 (1,01-2,09)	0,041	-	-
Assinatura Epigenética 4 CpG	Negativo	Referência		Referência	
	Positivo	1,24 (0,74-2,05)	0,403	-	-
Assinatura Epigenética 2 CpG	Negativo	Referência		Referência	
	Positivo	1,38 (0,77-2,44)	0,269	-	-

*Ajustada por estadiamento clínico e idade.

4.8.3 SOBREVIDA ESPECÍFICA POR CÂNCER

A sobrevida específica por câncer média dos pacientes foi de 20,61 meses, mínimo de 1,07 meses e máximo de 172 meses (mediana 10,57 meses e [IC 95% 7,63-11,02]).

Pacientes submetidos a tratamento com intenção paliativa ($p < 0,0001$), e em estadiamento clínico avançado ($p < 0,0001$) apresentaram uma sobrevida específica menor (**Figura 4.18**).

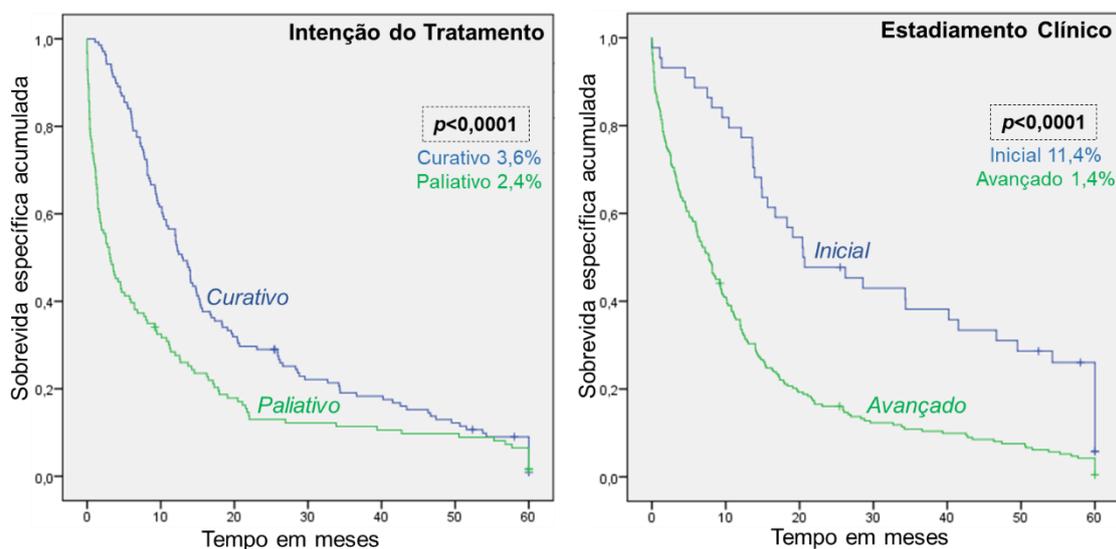


Figura 4.18: Curvas de sobrevida específica da população com CCEO pelo método Kaplan-Meier em função das características sociodemográficas e clínico-patológicas. São apresentadas as respectivas taxas de sobrevida média

específica para as variáveis intenção de tratamento e estadiamento clínico aos 60 meses de seguimento com respectivos *p* valor.

Na análise simples de Cox as variáveis intenção do tratamento e estadiamento clínico apresentaram-se como fatores de risco para a ocorrência de óbito por câncer de CCEO (**Tabela 4.18**).

Já no modelo múltiplo de Cox, após ajuste por estadiamento clínico e idade, apenas a variável intenção do tratamento (HR=1,43 [IC 95% 1,10-1,85] *p*=0,006) permaneceu no modelo, com risco de óbito por câncer 43% maior para quem fez o tratamento com objetivo paliativo em relação ao curativo (**Tabela 4.18**).

Tabela 4.18: *Análise da sobrevida específica: Avaliação do risco de ocorrência de óbito por câncer de CCEO em função das características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares.*

SOBREVIDA ESPECÍFICA		Univariada		Múltipla*	
VARIÁVEL	CATEGORIA	HR (95% IC)	<i>p</i>	HR (95% IC)	<i>p</i>
Sexo	Feminino	Referência	0,104	Referência	-
	Masculino	1,40 (0,93-2,10)		-	
Intenção do Tratamento	Curativo	Referência	≤0,0001	Referência	0,006
	Paliativo	1,67 (1,31-2,14)		1,43 (1,10-1,85)	
Tratamento Adjuvante	Sim	Referência	0,054	Referência	-
	Não	1,62 (0,99-2,66)		-	
Estadiamento Clínico	Inicial	Referência	≤0,0001	Referência	-
	Avançado	2,34 (1,66-3,32)		-	
p16	Negativo	Referência	0,306	Referência	-
	Positivo	0,79 (0,52-1,22)		-	
E6	Negativo	Referência	0,834	Referência	-
	Positivo	1,04 (0,70-1,53)		-	
Status HPV	Negativo	Referência	0,933	Referência	-
	Positivo	0,97 (0,59-1,60)		-	
Metilação Mediana de LINE-1	Hipometilado (≤55,90)	Referência	0,538	Referência	-
	Hipermetilado (>55,90)	1,08 (0,84-1,38)		-	
Assinatura Epigenética Padrão	Negativo	Referência	0,222	Referência	-
	Positivo	1,21 (0,88-1,67)		-	
Assinatura Epigenética 4 CpG	Negativo	Referência	0,661	Referência	-
	Positivo	1,07 (0,77-1,48)		-	
Assinatura Epigenética 2 CpG	Negativo	Referência	0,603	Referência	-
	Positivo	1,10 (0,75-1,62)		-	

*Ajustada por estadiamento clínico e idade.

Não foi observado impacto da IHQ para p16, PCRq para *E6*, *status* de HPV, metilação de LINE-1 ou dos modelos da assinatura epigenética do HPV com quatro ou dois sítios CpG na sobrevida dos pacientes. De todos os parâmetros moleculares avaliados, apenas a assinatura epigenética do HPV padrão composta por cinco sítios CpG apresentou impacto na sobrevida, onde os pacientes classificados como HPV positivos pela assinatura epigenética padrão apresentaram uma sobrevida livre de doença menor, com maior risco de desenvolver uma recidiva (HR=1,45 [IC 95% 1,01-2,09] $p=0,041$) (**Tabela 4.17**).

5 DISCUSSÃO

Os cânceres de cabeça e pescoço são classificados como o sexto tipo mais frequente em todo o mundo, sendo o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço o mais comum. Até 30% dos casos de CCECP são representados por CCE de orofaringe (CCEO), que se origina nas amígdalas, base da língua, palato mole e parede posterior da faringe, sendo responsável por aproximadamente 123.000 casos incidentes diagnosticados em todo o mundo (FURLAN *et al.*, 2017). O uso de tabaco e o consumo pesado de álcool representam os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CCECP e podem agir sinergicamente para aumentar o risco dessa malignidade (WRIGHT & MORGAN, 2013). Nos últimos anos, a incidência de CCECP vem diminuindo nos países desenvolvidos devido à redução da exposição ao tabaco. No entanto, há um aumento concomitante na incidência do CCEO como resultado da transformação de infecções por tipos de vírus do papiloma humano de alto risco, caracterizando assim a transição epidemiológica desta patologia (RIVERO & NUNES, 2006; ANG *et al.*, 2010; BETIOL *et al.*, 2013; HUBER & TANTIWONGKOSI, 2014; CASTELLSAGUE *et al.*, 2016). Com o propósito de auxiliar no entendimento da transição epidemiológica da carcinogênese da orofaringe num serviço de oncologia exclusivamente público do Brasil, foi desenhado este estudo. Para isso, a presente investigação avaliou o perfil dos pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe diagnosticados no INCA de 1999 a 2010, quanto às características sociodemográficas, clínico-patológicas e moleculares.

Os HPVs de alto risco são vírus sexualmente transmissíveis que podem afetar o epitélio das criptas das tonsilas palatina e lingual, levando a um fenótipo maligno. O HPV é um fator de risco independente para CCEO (DAYYANI *et al.*, 2010; FAKHRY *et al.*, 2014). O CCEO dirigido pelo HPV afeta predominantemente homens jovens e tipicamente não-fumantes, e mostra uma taxa de sobrevivência maior em comparação com os casos negativos para o HPV. O HPV de alto risco está presente em 45 a 90% do CCEO, mas esse número foi relatado como variando drasticamente de acordo com a área geográfica (MEHANNA *et al.*, 2013; ABOGUNRIN *et al.*, 2014; HUBER &

TANTIWONGKOSI, 2014; GILLISON *et al.*, 2015; LUPATO *et al.*, 2017). No Brasil, cerca de 27,4% (4-30%) dos CCEO são HPV positivos (RIBEIRO *et al.*, 2011; KAMINAGAKURA *et al.*, 2012; LÓPEZ *et al.*, 2014; HAUCK *et al.*, 2015; MATOS *et al.*, 2015; BETIOL *et al.*, 2016; PIÑA *et al.*, 2016). Uma baixa frequência da infecção pelo HPV foi observada em nosso estudo (6,1%), dentre os casos positivos para HPV, predominaram homens (90,4%), com idade média de 60 anos (42-89 anos) tabagistas (95,2%) e etilistas (90,4%). Apresentando assim, um perfil de CCEO distinto do atribuído ao CCEO induzido por HPV.

Resultados discrepantes encontrados na literatura podem ser explicados de acordo com o sítio da orofaringe acometido e pelo emprego de diferentes técnicas na detecção do HPV, assim como também pode ser explicado por diferenças sociais, étnicas e geográficas que certamente influenciam o processo de carcinogênese.

Este subconjunto de CCEO HPV positivo localizado preferencialmente em amígdala também apresenta características histológicas e moleculares diferentes dos CCEO convencionais, pois estes são geralmente não-ceratinizantes, com morfologia predominantemente basalóide e expressam fortemente p16 (THAVARAJ *et al.*, 2011; PIÑA *et al.*, 2016; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Apenas 4,2% dos tumores estavam localizados na amígdala, seis casos (1,7%) apresentaram morfologia basalóide e um único caso (0,3%) apresentou esta morfologia não-ceratinizante neste estudo, o que já poderia explicar o baixo número de casos positivos para p16 (9,2%).

Além disso, o alto índice de paciente tabagistas (94,5%) e etilistas (88,2%) neste estudo corrobora o fato de que estes sejam, ainda, os principais fatores de risco para o câncer de orofaringe na nossa população. Ribeiro *et al.* (2011) encontraram correlação entre pacientes fumantes e tumores HPV negativo. Um possível mecanismo para explicar esta interação seria a atuação dos carcinógenos do tabaco ou álcool em outras vias da carcinogênese, diferentes de p53 e pRb (CLEARY *et al.*, 2016).

A baixa prevalência de HPV no estadiamento clínico avançado é relatada por alguns autores (SCHACHE *et al.*, 2011; KATANODA & YAKO-SUKETOMO, 2012), que afirmam que tumores em estadiamento clínico III e IV

são menos infectados pelo HPV. Os resultados obtidos por este trabalho concordam com este dado, pois a maioria dos pacientes (80%) possuía estadiamento clínico avançado (III e IV) e foram negativos para HPV.

Diversas técnicas na detecção do HPV na orofaringe são utilizadas. O HPV pode ser detectado por ensaios a nível do DNA (hibridização *in situ* ou PCR), RNAm (hibridização *in situ* ou RT-PCR) e proteína (imuno-histoquímica p16) realizados individualmente ou em combinação (WESTRA, 2014). A imuno-histoquímica para a superexpressão de p16 emergiu como um biomarcador substituto robusto para carcinogênese mediada por HPV de alto risco e pode ser suficiente como um teste para o *status* de HPV em tumores com morfologia não ceratinizante apropriada (LEWIS, 2012). A possibilidade de perda da expressão de p16 também deve ser considerada, especialmente em pacientes com fatores de risco tradicionais (consumo de tabaco e álcool), e testes adicionais para detecção do vírus de alto risco devem ser realizados (BEGUM *et al.*, 2003).

Dessa forma, optou-se pela combinação de dois testes, inicialmente a coloração imuno-histoquímica para p16, seguida pelo PCR quantitativo para detecção do DNA *E6* do HPV 16, que é adotado por alguns trabalhos (ZHAO *et al.*, 2005; BRAAKHUIS *et al.*, 2009; THOMAS & PRIMEAUX, 2012; EL-NAGGAR & WESTRA, 2012 FURLAN *et al.*, 2017). Este trabalho adotou a combinação dos resultados da imuno-histoquímica para p16 com a posterior avaliação de DNA do gene *E6* do HPV para estabelecer o *status* HPV da população.

Existem diferenças substanciais entre os estudos que diagnosticam o HPV e definem a superexpressão do p16 (GRØNHØJ LARSEN *et al.*, 2014). O ponto de corte estabelecido neste estudo, para presença de HPV por imuno-histoquímica de p16 foi marcação citoplasmática e nuclear forte e difusa presente em mais de 70% das células tumorais (9,2%). Tal fato baseia-se na premissa que numericamente, a coloração de p16 é mais eficiente para prever a presença de HPV (ou seja, maior sensibilidade), quando o *cut-off* estabelecido é >70% de coloração citoplasmática e nuclear das células neoplásicas (THAVARAJ *et al.*, 2011; EVANS *et al.*, 2013; GRØNHØJ LARSEN *et al.*, 2014).

A avaliação da presença do gene *E6* do HPV 16 foi realizada por PCR quantitativo, onde a partir da curva padrão com casos de adenocarcinoma de colo de útero HPV 16 estabeleceu-se o *cut-off*, então foram considerados positivos para HPV (11,9%) os casos que apresentavam Ct de amplificação igual ou inferior ao do controle positivo, a partir da mesma quantidade de DNA. Um estudo anterior deste grupo pesquisa avaliou a prevalência do HPV em CCE de esôfago (HERBSTER *et al.*, 2012) e diante dessa experiência prévia, optou-se por utilizar este *cut-off* com o intuito de minimizar “falsos positivos” frente ao tipo de material, emblocado em parafina, utilizado no estudo.

O PCR quantitativo é um método relativamente fácil e confiável de quantificar o alvo em questão. Por ser uma técnica sensível, a capacidade de descartar lesões falsamente positivas e contaminadas parece ser a vantagem deste ensaio, que também nos permitiu descartar aquelas lesões que não atendem aos requisitos mínimos para uma população de células infectadas por HPV. Na literatura a avaliação da carga viral do HPV por PCR quantitativo tem sido utilizada. O número de cópias do DNA de *E6* é determinado em cada amostra por extrapolação da curva padrão e são considerados positivos para HPV os casos com um número ≥ 100 cópias por célula (HA *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2005; FURLAN *et al.*, 2017).

Surge então a questão, até que ponto as amostras com baixos números de cópias de DNA de HPV detectadas contribuem significativamente para a carcinogênese do CCEO. Sabe-se que, sem cópias suficientes de HPV afetando a maioria das células tumorais, é improvável que o HPV desempenhe um papel importante nos primeiros estágios de iniciação e progressão do tumor, sem pelo menos uma cópia viral por genoma não é possível estabelecer uma relação clonal. Já nos casos em que um número de cópias virais alto é detectado, ainda não está claro se isso é devido a uma célula com múltiplas cópias de DNA de HPV (isto é, infecção viral produtiva por HPV) ou se é o resultado de múltiplas células com uma cópia viral (HA *et al.*, 2002). Visto isso, optou-se pelo ponto de corte baseado em casos de tumores cervicais sabidamente HPV 16 positivos como padrão, já que o HPV é o *driver* dessa carcinogênese.

Dessa forma, estabelecemos um *cut-off* rigoroso para o *status* HPV na nossa população (6,1%) baseado na combinação dos resultados positivo para p16 e presença de *E6*. O propósito desse estudo não era apenas identificar casos HPV positivos, mas sim identificar os casos onde a carcinogênese tenha sido induzida exclusivamente pelo vírus, fato esse não confirmado pelos resultados. A identificação do HPV, como um vírus oportunista na microbiota da cavidade oral, orofaringe e laringe tem sido realizada de modo corriqueiro. Dados mostraram que a incidência de HPV foi significativamente mais elevada (36%) entre pacientes com câncer de orofaringe quando comparados com câncer de boca (23,5%) ou laringe (24%) (DAYYANI *et al.*, 2010). Contudo, ainda não está esclarecido se a alta frequência de HPV nestes cânceres consiste em HPVs biologicamente relevantes, embora há uma tendência, confirmada pela publicação de vários relatos, confirmando a participação do HPV na carcinogênese apenas da orofaringe (WEINBERGER *et al.*, 2006; GILLISON *et al.*, 2015). Esse achado não implica necessariamente que o HPV não desempenhe um papel na progressão para o câncer em outros locais. No entanto, isso mostra que a infecção pelo HPV não é prevalente no desenvolvimento do CCE de boca e laringe (HA *et al.*, 2002; WEINBERGER *et al.*, 2006).

O sistema de estadiamento TNM reconheceu a crescente incidência de tumores relacionados ao HPV da orofaringe e hoje, se faz necessário para uma melhor discriminação entre os estadiamentos o teste para p16 (AJCC, 2017). A imuno-histoquímica para a superexpressão de p16 emergiu como um biomarcador substituto robusto para carcinogênese mediada por HPV de alto risco (EL-NAGGAR & WESTRA, 2012). Frente aos resultados obtidos, onde nesta instituição predominam os casos CCEO ceratinizantes, p16 negativos em pacientes tabagistas e etilistas, talvez mais de uma técnica seja necessária para estabelecer *status* de HPV mais adequado pelo perfil da nossa população. Há ainda a possibilidade da expressão aumentada do p16 estar envolvida com outros fatores de risco não relacionados ao HPV, um mecanismo alternativo seria a ocorrência de distúrbios na via do retinoblastoma, como a inativação mutacional da *pRB* (MARUR *et al.*, 2010). Portanto, o custo benefício da utilização da IHQ para análise da expressão de p16 em substituição à detecção

do DNA e/ou RNA do HPV em CCEO deve ser mais amplamente avaliada. Dessa forma, a expressão de p16 por imuno-histoquímica poderia ser utilizada como *screening* para detecção de casos positivos e estabelecimento da classificação TNM, não dispensando, para o CCEO p16 positivo, a detecção viral por técnicas moleculares.

Em CCEO, o *status* da infecção pelo HPV tem sido considerado um importante indicador de prognóstico, pois tem-se atribuído uma melhor resposta ao tratamento em pacientes com CCEO HPV positivos, caracterizando esta patologia como uma neoplasia diferenciada (ANG *et al.*, 2010; GILLISON *et al.*, 2015). Mas por que o CCEO positivo para HPV responde melhor ao tratamento do que o câncer cervical positivo para HPV quando o agente etiológico é o mesmo? Embora muito ainda precise ser elucidado sobre a história natural dessas doenças, diferenças patológicas importantes podem fornecer dados. 1) Imunologicamente, a orofaringe pode responder melhor por causa de sua riqueza em tecido linfóide/imunológico, com reconhecimento potencialmente aumentado e estimulação imunológica contra antígenos tumorais específicos de vírus (ELREFAEY *et al.*, 2014); 2) em contraste, a composição do microbioma cervical pode ser mais favorável à persistência do HPV. Por exemplo, a vaginose bacteriana concomitante, uma condição caracterizada pela depleção de espécies de *Lactobacillus*, crescimento excessivo de espécies anaeróbicas e pH vaginal mais alto, tem sido associada com *clearance* tardio de HPV e neoplasia intra-epitelial (MITRA *et al.*, 2015); 3) o CCEO HPV positivo apresenta-se mais comumente com massa cervical palpável (MOORE & MEHTA, 2015), em comparação com o câncer do colo de útero, que geralmente é assintomático ou tem sangramento ou secreção anormal. O CCEO HPV positivo mais avançado se dissemina locorregionalmente para o pescoço, permitindo uma detecção precoce, enquanto o câncer cervical avançado, se espalha internamente e mais distalmente (BERMAN & SCHILLER, 2017); 4) depois do estágio inicial no diagnóstico, o estadiamento de forma geral entre o câncer do colo de útero e o CCEO não é comparável. Por exemplo, o estágio IVA do CCEO ainda não metastatizou, enquanto o câncer cervical do estágio IVA já se espalhou em órgãos adjacentes, como reto ou bexiga (BERMAN & SCHILLER, 2017); 5)

epidemiologicamente, 85% dos cânceres do colo de útero ocorrem no mundo em desenvolvimento (FERLAY *et al.*, 2015) *versus* a maioria dos CCEO positivos para o HPV que ocorrem nos Estados Unidos e na Europa. Com o aumento do acesso à saúde nas nações desenvolvidas, a população com CCEO HPV positivo pode ter uma vantagem econômica em termos de melhor tratamento. Além disso, podem apresentar melhor estado nutricional e menos co-morbidades do que mulheres de países em desenvolvimento (BERMAN & SCHILLER, 2017). Visto isso, diferentes estudos têm identificado frequências relativamente altas de HPV em CCEO no Brasil (RIBEIRO *et al.*, 2011; KAMINAGAKURA *et al.*, 2012; LÓPEZ *et al.*, 2014; HAUCK *et al.*, 2015; MATOS *et al.*, 2015; BETIOL *et al.*, 2016; PIÑA *et al.*, 2016), indo contra os nossos resultados, com apenas 6,1% de CCEO HPV positivo. No entanto, quando avaliamos as instituições de origem destes estudos observamos uma discrepância, as altas taxas de CCEO HPV positivos são oriundos de institutos privados, caracterizando uma disparidade social, pois nossos resultados refletem o perfil da população assistida pelo Sistema Único de Saúde (SUS).

Possivelmente, a melhor resposta ao tratamento em pacientes com CCEO HPV positivos deve-se à maior sensibilidade do tumor à quimiorradioterapia, em comparação com CCEO HPV negativos. Esta sensibilidade é aumentada devido aos danos secundários à incorporação das oncoproteínas E6 e E7 na célula tumoral (MARUR *et al.*, 2010). A presença de *TP53* funcional nos tumores HPV positivos, o que não ocorre no CCEO associado ao tabaco, pode explicar também a melhor resposta ao tratamento, já que este gene pode induzir vias apoptóticas, tornando o tumor mais sensível à apoptose induzida pela radiação (RAGIN & TAIOLI, 2007). Nosso estudo não observou uma melhor resposta ao tratamento dos pacientes HPV positivos quando comparados aos HPV negativos, fato possivelmente explicado pelo predomínio de pacientes matriculados no INCA já em estadiamento clínico avançado (80%).

Atualmente, nenhum programa efetivo de rastreio para CCEO existe porque não há evidências de lesões precursoras identificadas, diferentemente do visto no câncer de colo do útero (KREIMER & CHATURVEDI, 2011). Uma reflexão a esse respeito nos leva a pensar se a história natural do HPV na

indução do câncer de orofaringe é distinta da evolução do HPV na carcinogênese do colo de útero. Talvez estejamos diante de modelos de evolução tumoral distintos, o modelo clássico de evolução tumoral propélido por um ritmo gradual (câncer do colo de útero) e um modelo alternativo conduzido pelo equilíbrio pontuado (câncer de orofaringe). No gradualismo, ocorre um período de latência entre as alterações que leva ao desenvolvimento do tumor (*driver*), sendo necessários múltiplos eventos de transformação independentes para que a doença ocorra – presença da infecção pelo HPV de alto risco, seguidas de lesões de baixo grau e alto grau, para posterior transformação neoplásica maligna do colo de útero. Já no modelo de equilíbrio pontuado, esse desenvolvimento pode ser dividido em: evento iniciador e o evento transformador do câncer. Sob este modelo, a maioria das mutações se acumularia numa fase pré-neoplásica prolongada – infecção pelo HPV de alto risco. A transformação, provavelmente devido a uma instabilidade genômica (alterações do número de cópias do DNA), desencadeada por evento cataclísmico, levaria rapidamente ao câncer invasivo e metástases (NOTTA *et al.*, 2016).

A diversidade biológica que caracteriza subgrupos de tumores com prognóstico diferente é um importante pano de fundo para a identificação de marcadores moleculares de potencial utilidade clínica. A esse respeito, vários estudos enfocaram os mecanismos subjacentes às diferenças no comportamento clínico e molecular entre CCEO positivos e negativos para HPV (KLUSSMANN *et al.*, 2009; ALLEN *et al.*, 2010; ANG *et al.*, 2010). Dados recentes sugerem que as mudanças epigenéticas influenciam profundamente a biologia do CCEO e podem contribuir, pelo menos em parte, para as diferentes respostas terapêuticas mostradas pelo CCEO positivo ou negativo para HPV (VAN KEMPEN *et al.*, 2014). Neste contexto, a metilação do DNA genômico em dinucleotídeos CpG, sem dúvida, representa um dos reguladores epigenéticos mais amplamente caracterizados da expressão gênica (FURLAN *et al.*, 2017).

Com esse enfoque, a hipometilação dos longos elementos nucleares intercalados-1 (LINE-1), um substituto amplamente aceito do conteúdo geral da metilação do DNA genômico, tem sido associada a uma pior sobrevida global e/ou livre de progressão em diversos tumores (OGINO *et al.*, 2008; SAITO *et*

al., 2010; VAN HOESEL *et al.*, 2012). No entanto, a hipometilação de LINE-1 também se correlacionou com a melhora da sobrevida global em várias neoplasias, sugerindo que os efeitos biológicos subjacentes da hipometilação do LINE-1 no desfecho do paciente podem depender do tipo tumoral (ROMÁN-GÓMEZ *et al.*, 2006; SIGALOTTI *et al.*, 2012). A hipometilação de LINE-1 está associada a um maior risco de desenvolver recidiva precoce em pacientes com CCEO (FURLAN *et al.*, 2017). O nível de metilação LINE-1 não impactou na sobrevida da população deste estudo, no entanto, vale ressaltar que o nível de metilação LINE-1 foi significativamente maior em pacientes com CCEO positivos para HPV do que em CCEO HPV negativos ($p < 0,0001$), evidenciando a diferença molecular entre esses tumores, onde os tumores HPV positivos estão hipermetilados enquanto os HPV negativos estão hipometilados para LINE-1.

O crescente papel da metilação aberrante na biologia da CCEO sugere fortemente a oportunidade de testar marcadores de metilação como indicadores potenciais do prognóstico da doença. Além de estudos que investigam o papel prognóstico do *status* de metilação de genes específicos, o estudo do metiloma, que engloba a totalidade dos sítios metilados do DNA genômico, gera interesse crescente frente a seu valor promissor como marcador prognóstico no câncer humano (FURLAN *et al.*, 2017). Um estudo recentemente que nosso grupo participou, identificou uma assinatura epigenética mínima (*B3GALT6-SDF4*, *SYCP2-FAM127B* e *HTLF-HLTFAS1*) para a identificação de casos HPV positivos, que apresentou alta especificidade (>95%) independentemente da localização anatômica (DEGLI ESPOSTI *et al.*, 2017). Na população estudada o nível de metilação da assinatura epigenética padrão do HPV foi significativamente menor em pacientes com CCEO positivos para HPV do que em CCEO HPV negativos ($p < 0,0001$), seguindo o modelo proposto com cinco sítios CpG, no entanto identificou como HPV positivo 38,9% dos CCEO, valor próximo dos 36% esperado para CCEO mundialmente (DAYYANI *et al.*, 2010). Quando avaliamos os modelos de assinatura epigenética com quatro sítios CpG e dois sítios CpG, identificamos como HPV positivo 33,8% e 13,6% dos casos de CCEO, respectivamente. Nos parece que o modelo de assinatura epigenética

com dois sítios CpG para identificação do HPV seja o mais adequado para a população aqui estudada, por apresentar valor de positividade para HPV próximo aos obtidos com IHQ para p16 e PCRq para *E6*. Tal modelo é condizente com o tipo de material avaliado, embebido em parafina frente ao tecido fresco utilizado na assinatura epigenética padrão do HPV. Apesar de não estimar que a assinatura epigenética possa substituir os métodos atuais de diagnóstico de HPV, a assinatura sinaliza ser um preditor promissor de sobrevida para CCEO (HR=1,45 [IC 95% 1,01-2,09] $p=0,041$, SLD). No entanto, a assinatura deve ser testada em coortes maiores de pacientes com CCEO, usando modelos estatísticos multivariados, para melhorar o poder e, eventualmente, fornecer um melhor marcador para o estabelecimento de tratamentos mais direcionados, especialmente quando se considera o *status* do HPV para esquemas de tratamento oncológico.

Contudo, não foi observado impacto sobre as sobrevidas global, livre de doença e específica dos pacientes a IHQ para p16, PCRq para *E6*, *status* de HPV ou metilação de LINE-1 no nosso estudo. Apenas a assinatura epigenética do HPV apresentou impacto na sobrevida, onde os pacientes HPV positivos apresentaram uma sobrevida livre de doença menor, com maior risco de desenvolver uma recidiva (HR=1,45 [IC 95% 1,01-2,09] $p=0,041$). Os aspectos da carcinogênese clássica da orofaringe como etilismo (HR=1,74 [IC 95% 1,15-2,63] $p=0,009$, SG), intenção do tratamento (HR=1,38 [IC 95% 1,08-1,78] $p=0,011$, SG / HR=1,43 [IC 95% 1,10-1,85] $p=0,006$, SEC) e tratamento adjuvante (HR=1,84 [IC 95% 1,13-3,05] $p=0,015$, SG / HR=2,15 [IC 95% 1,25-3,68] $p=0,005$, SLD) apresentaram valores prognósticos independentes para as sobrevidas avaliadas.

Corroborando nossos achados a respeito da sobrevida da população com CCEO com Ang *et al.* (2010) e Furlan *et al.* (2017), sabe-se que embora a positividade do HPV represente um forte fator de prognóstico tanto para uma melhor sobrevida quanto para um risco reduzido de recidiva, existe um subconjunto de pacientes com CCEO HPV positivo que ainda apresenta resultados ruins. Além disso, os pacientes com CCEO negativos para o HPV, têm um risco ainda maior de recidiva apesar do tratamento intensivo (ANG *et al.*, 2010; FURLAN *et al.*, 2017). Nossos dados confirmam que o

comportamento biológico de um tumor positivo para HPV pode ser alterado pelo uso de tabaco. Alterações genéticas induzidas por carcinogênicos associados ao tabaco podem tornar os tumores positivos para HPV menos responsivos à terapia e probabilidade de tais alterações genéticas parece aumentar à medida que o número de maços/ano de consumo de tabaco aumenta (ANG *et al.*, 2010).

Conhecendo a frequência da infecção por HPV, algumas condutas poderiam ser modificadas, como: adoção de terapias menos agressivas; redução de toxicidade e reações adversas à terapia; redução de custos do tratamento e melhoria da qualidade de vida do paciente com CCEO. No entanto, devido ao reduzido número de tumores HPV positivos na nossa população, não foi possível traçar a correlação entre o *status* da infecção por HPV e as variáveis utilizadas para avaliar valor prognóstico. Portanto, o HPV não se mostrou um indicador eficiente de prognóstico em CCEO para os pacientes do INCA.

O estudo apresentou algumas limitações no seu desenvolvimento, por ser retrospectivo foi realizada a coleta dos dados secundários, assim observamos algumas perdas de seguimento. Logo, para os experimentos foram utilizadas amostras tumorais emblocadas em parafina, o que pode representar uma redução na capacidade de detecção do HPV. Além disso, a ampla maioria dos pacientes matriculados apresentava doença avançada, assim houve indisponibilidade de blocos de parafina referentes ao tumor, pois esses não foram submetidos a cirurgia e não trouxeram para a instituição os blocos oriundos das biópsias diagnósticas realizadas fora do INCA, gerando uma redução na casuística. Tentou-se fazer a mensuração da expressão dessas moléculas investigadas de forma rígida, no entanto foi em parte limitante pois a literatura em geral não apresenta um padrão de análise. A quantificação do gene *E6* do HPV associada a descrição do padrão de expressão de p16 podem otimizar a análise dos resultados tornando-os mais reprodutíveis.

Os resultados obtidos nessa investigação estabelecem o perfil do CCEO num serviço de oncologia exclusivamente público do Brasil, auxiliando no entendimento da transição epidemiológica da carcinogênese da orofaringe no

país, contribuindo com implicações importantes na prevenção, no diagnóstico e tratamento desses pacientes, além da introdução de novos biomarcadores. Visto que, o tratamento e o prognóstico para CCEO ainda são problemáticos, pois os métodos disponíveis na rotina para o prognóstico, como TNM, são limitados, estimulando pesquisas em busca de novas metodologias e/ou marcadores mais específicos para o prognóstico. A literatura apresenta uma vasta gama de resultados clínicos, histopatológicos e de promissores marcadores moleculares correlacionados com o prognóstico do CCEO, a maioria ainda com dados contraditórios ou não validados. Isso reflete não apenas a complexidade do processo de carcinogênese da orofaringe, mas também as limitações dos estudos, tais como os de amostragens pequenas ou não uniformes, quanto a localização do tumor, modalidade de tratamento, estadiamento (TNM), além da heterogeneidade dos temas investigados. Vale ressaltar ainda, as diferenças nos valores de corte usados para cada variável nos estudos, que também contribuem para achados conflitantes.

Nosso trabalho identificou o perfil dos pacientes com CCEO do INCA, além da frequência do HPV nesta população e alterações em genes que podem ser importantes para a carcinogênese da orofaringe, e logo merecem ser investigados mais a fundo. Este foi o primeiro trabalho avaliando câncer de orofaringe e metilação no INCA, passo inicial para elucidar o papel das alterações epigenética na carcinogênese da orofaringe.

6 CONCLUSÕES

- Homens brancos, com idade entre 41-60 anos, etilistas e tabagistas com tumores moderadamente diferenciados, em estadiamento clínico IV, tratados com radioterapia exclusiva e *status* de HPV negativo refletem o perfil dos pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe diagnosticados no INCA.

- Na população de estudo, foram positivos para a expressão da proteína p16 por imuno-histoquímica apenas 9,2% dos casos.

- A presença do gene *E6* do HPV do tipo 16 foi evidenciada em 11,9% da casuística através da reação em cadeia da polimerase quantitativa.

- Os níveis de metilação da LINE-1, *HLTF-AS1*, *FAM217B* e *B3GALT6* em amostras de tecido tumoral de carcinoma de células escamosas de orofaringe foram em grande parte heterogêneos. Os casos HPV positivos apresentam-se hipermetilados para LINE-1 e hipometilados para *HLTF-AS1*, *FAM217B* e *B3GALT6*.

- Em relação ao *status* de HPV, apenas 21 casos (6,1%) foram classificados como HPV positivos. O *status* de HPV está associado ao perfil de metilação de LINE-1 e a assinatura epigenética padrão do HPV (*HLTF-AS1*, *FAM217B* e *B3GALT6*). As curvas ROC comparando o *status* de HPV com o padrão de metilação de LINE-1 e com apresenta o padrão de metilação da assinatura epigenética do HPV apresentam alta AUC, sensibilidade e especificidade. No entanto o *status* de HPV não apresentou associação com os dados clínico-patológicos dessa população.

- O estímulismo, intenção do tratamento e tratamento adjuvante são valores independentes para a sobrevida global. Para a sobrevida livre de doença, o tratamento adjuvante é fator de risco independente. Já para a sobrevida específica por câncer a intenção do tratamento é considerada independente para esta população de estudo. Como visto, o *status* de HPV não impactou na sobrevida global, livre de doença e específica por câncer na população deste estudo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOGUNRIN, S.; DI TANNA, G. L.; KEEPING, S. *et al.* Prevalence of human papillomavirus in head and neck cancers in European populations: A meta-analysis. **BMC Cancer**, 14(968):1-13, 2014.

AJCC. American Joint Committee on Cancer. **AJCC Cancer Staging Manual**. Chicago: Springer, 2017. 54p.

ALLEN, C. T.; LEWIS JR, J. S.; EL-MOFTY, S. K. *et al.* Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. **Laryngoscope**, 120(9):1756-1772, 2010.

ANANTHARAMAN, D.; GHEIT, T.; WATERBOER, T. *et al.* Human papillomavirus infections and upper aero-digestive tract cancers: the ARCAGE study. **J Natl Cancer Inst**, 105(8):536-545, 2013.

ANG, K. K.; HARRIS, J.; WHEELER, R. *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **N Engl J Med**, 363(1):24-35, 2010.

BABA, Y.; MURATA, A.; WATANABE, M. *et al.* Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. **Surg Today**, 44(10):1807-1816, 2014.

BAGARELLI, L. B., OLIANI, A. H. Tipagem e estado físico de papilomavírus humano por hibridização in situ em lesões intra-epiteliais do colo uterino. **Rev Bras Ginecol Obstet**, 26(1):59-64, 2004.

BAGNARDI, V.; ROTA, M.; BOTTERI, E. *et al.* Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose-response meta-analysis. **Br J Cancer**, 112(3):580-593, 2015.

BEGUM, S.; CAO, D.; GILLISON, M. *et al.* Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. **Clin Cancer Res**, 11(16):5694-5699, 2005.

BEGUM, S.; GILLISON, M. L.; ANSARI-LARI, M. A. *et al.* Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. **Clin Cancer Res**, 9(17):6469-6475, 2003.

BERMAN, T. A.; SCHILLER, J. T. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. **Cancer**, 123(12):2219-2229, 2017.

BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet**, 9(16):2395-402, 2000.

BETIOL, J. C.; SICHERO, L.; COSTA, H. O. O. *et al.* Prevalence of human papillomavirus types and variants and p16(INK4a) expression in head and neck squamous cells carcinomas in São Paulo, **Brazil**. **Infect Agent Cancer**, 11(20):1-7, 2016.

BETIOL, J.; VILLA, L. L.; SICHERO, L. Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 46(3):217-226, 2013.

BHATTACHARYA, A.; ROY, R.; SNIJDERS, A. M. *et al.* Two distinct routes to oral cancer differing in genome instability and risk for cervical node metastasis. **Clin Cancer Res**, 17(22):7024-7034, 2011.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, 16(1):6-21, 2002.

BIRD, G.; O'DONNELL, M.; MOROIANU, J. *et al.* Possible role for cellular karyopherins in regulating polyomavirus and papillomavirus capsid assembly. **J Virol**, 82(20):9848-9857, 2008.

BISHOP, J. A.; MA, X. J.; WANG, H. *et al.* Detection of transcriptionally active high-risk HPV in patients with head and neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA in situ hybridization method. **Am J Surg Pathol**, 36(12):1874-1882, 2012.

BOCK, C.; LENGAUER, T. Computational epigenetics. **Bioinformatics**, 24(1):1-10, 2008.

BOSCOLO-RIZZO, P.; SCHROEDER, L.; ROMEO, S. *et al.* The prevalence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of unknown primary site metastatic to neck lymph nodes: a systematic review. **Clin Exp Metastasis**, 32(8):835-845, 2015.

BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H.; MEIJER, C. J. *et al.* Human papilloma virus in head and neck cancer: the need for a standardised assay to assess the full clinical importance. **Eur J Cancer**, 45(17):2935-2939, 2009.

BRAAKHUIS, B. J.; TABOR, M. P.; KUMMER, J. A. *et al.* A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. **Cancer Res**, 63(8):1727-1730, 2003.

BRANDWEIN-GENSLER, M.; TEIXEIRA, M. S.; LEWIS, C. M. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am J Surg Pathol**, 29(2):167-178, 2005.

BRAVI, F.; BOSETTI, C.; FILOMENA, M. *et al.* Foods, nutrients and the risk of oral and pharyngeal cancer. **Br J Cancer**, 109(11):2904-2910, 2013.

BRODERS, A. C. The microscopic grading of cancer. **Surg Clin North Am**, 21(4):947-962, 1941.

BRYNE, M.; BOYSEN, M.; ALFSEN, C. G. *et al.* The invasive front of carcinomas. The most important area for tumor prognosis? **Anticancer Res**, 18(6B):4757-4764, 1998.

CASTELLSAGUE, X.; ALEMANY, L.; QUER, M. *et al.* HPV involvement in head and neck cancers: comprehensive assessment of biomarkers in 3680 patients. **J Natl Cancer Inst**, 108(6):1-12, 2016.

CASTRO, T. M. P. P. G.; DUARTE, M. L. Condiloma lingual: relato de caso clínico. **Rev Bras Otorrinolaringol**, 70(4):565-8, 2004.

CASTRO, T. M.; BUSSOLOTI FILHO, I.; NASCIMENTO, V. X. *et al.* HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. **Braz J Otorhinolaryngol**, 75(2):167-171, 2009.

CAVENAGHI, V. B.; GHOSN, E. J.; CRUZ, N. *et al.* Determination of HPV prevalence in oral/oropharyngeal mucosa samples in a rural district of São Paulo. **Braz J Otorhinolaryngol**, 79(5):599-602, 2013.

CHATURVEDI, A. K.; ANDERSON, W. F.; LORTET-TIEULENT, J. *et al.* Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. **J Clin Oncol**, 31(36):4550-4559, 2013.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; PFEIFFER, R. M. *et al.* Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **J Clin Oncol**, 29(32):4294-4301, 2011.

CHERNOCK, R. O.; EL-MOFTY, S. K.; THORSTAD, W. L. *et al.* HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. **Head Neck Pathol**, 3(3):186-194, 2009.

CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma - an update. **CA Cancer J Clin**, 65(5):401-421, 2015.

CLEARY, C.; LEEMAN, J. E.; HIGGINSON, D. S. *et al.* Biological features of human papillomavirus related head and neck cancers contributing to improved response. **Clin Oncol (R Coll Radiol)**, 28(7):467-474, 2016.

COSKUN, H. H.; FERLITO, A.; MEDINA, J. E. *et al.* Retropharyngeal lymph node metastases in head and neck malignancies. **Head Neck**, 33(10):1520-1529, 2011.

COSTA, A. L. L. S.; PEREIRA, J. C.; NUNES, A. A. F. *et al.* Correlação entre classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesq Odontol Bras**, 16(3):216-220, 2002.

D'SOUZA, G.; DEMPSEY, A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. **Prev Med**, 53(S1):5-11, 2011.

DAHLGREN, L.; DAHLSTRAND, H. M.; LINDQUIST, D. *et al.* Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. **Int J Cancer**, 112(6):1015-1019, 2004.

DAYYANI, F.; ETZEL, C. J.; LIU, M. *et al.* Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). **Head Neck Oncol**, 2(15):1-11, 2010.

DEGLI ESPOSTI, D.; SKLIAS, A.; LIMA, S. C. *et al.* Unique DNA methylation signature in HPV-positive head and neck squamous cell carcinomas. **Genome Med**, 9(33):1-12, 2017.

DIVARIS, K.; OLSHAN, A. F.; SMITH, J. *et al.* Oral health and risk for head and neck squamous cell carcinoma: the Carolina Head and Neck Cancer Study. **Cancer Causes Control**, 21(4):567-575, 2010.

D'SOUZA, G.; KREIMER, A. R.; VISCIDI, R. *et al.* Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N Engl J Med**, 356(19):1944-1956, 2007.

DURZYNSKA, J.; LESNIEWICZ, K.; POREBA, E. Human papillomaviruses in epigenetic regulations. **Mutat Res Rev Mutat Res**, 772(2):36-50, 2017.

EHRlich, M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. **Oncogene**, 21(35):5400-5413, 2002.

EL-MOFTY, S. K.; ZHANG, M. O.; OAVILA, R. M. Histologic identification of human papillomavirus (HPV)-related squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes: a reliable predictor of the site of an occult head and neck primary carcinoma. **Head Neck Pathol**, 2(3):163-168, 2008.

EL-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K. C.; GRANDIS, J. R. *et al.* World health organization classification of tumours. **WHO Classification of Head and Neck Tumors**. Lyon: IARC Press, 2017. 133p.

EL-NAGGAR, A. K.; WESTRA, W. H. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency. **Head Neck**, 34(4):459-461, 2012.

ELREFAEY, S.; MASSARO, M. A.; CHIOCCA, S. *et al.* HPV in oropharyngeal cancer: the basics to know in clinical practice. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, 34(5):299-309, 2014.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nat Rev Genet**, 8(4):286-298, 2007.

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **N Engl J Med**, 358(11):1148-1159, 2008.

EVANS, M.; NEWCOMBE, R.; FIANDER, A. *et al.* Human Papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: an observational study of diagnosis, prevalence and prognosis in a UK population. **BMC Cancer**, 13(220):1-10, 2013.

FAKHRY, C.; GILLISON, M. L.; D'SOUZA, G. Tobacco use and oral HPV-16 infection. **JAMA**, 312(14):1465-1467, 2014.

FAKHRY, C.; PSYRRI, A.; CHATURVEDHI, A. HPV and head and neck cancers: State-of-the-science. **Oral Oncology**, 50(5): 353-355, 2014.

FAKHRY, C.; WESTRA, W. H.; LI, S. *et al.* Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. **J Natl Cancer Inst**, 100(4):261-269, 2008.

FELLER, L.; KHAMMISSA, R. A.; WOOD, N. H. *et al.* Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. **Infect Agent Cancer**, 4(16):1-9, 2009.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R. *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, 136(5):E359-E386, 2015.

FERRAZ, L. D. C.; SANTOS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **J Health Sci Inst**, 30(2):107-111, 2012.

FISCHER, C. A.; KAMPMANN, M.; ZLOBEC, I. *et al.* p16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. **Ann Oncol**, 21(10):1961-1966, 2010.

FORMAN, D.; DE MARTEL, C.; LACEY, C. J. *et al.* Global burden of human papillomavirus and related diseases. **Vaccine**, 30(S5):F12-F23, 2012.

FRANCESCHI, S.; BIDOLI, E.; HERRERO, R. *et al.* Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: Etiological clues. **Oral Oncol**, 36(1):106-115, 2000.

FURLAN, C.; POLESEL, J.; BARZAN, L. *et al.* Prognostic significance of LINE-1 hypomethylation in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Clin Epigenetics**, 9(58):1-11, 2017.

FURNISS, C. S.; MARSIT, C. J.; HOUSEMAN, E. A. *et al.* Line region hypomethylation is associated with lifestyle and differs by human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 17(4):966-971, 2008.

GANGULY, N.; PARIHAR, S. P. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins as risk factors for tumorigenesis. **J Biosci**, 34(1): 113-123, 2009.

GILLISON, M. L.; ALEMANY, L.; SNIJDERS, P. J. *et al.* Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. **Vaccine**, 30(S5):34-54, 2012.

GILLISON, M. L.; BROUTIAN, T.; PICKARD, R. K. *et al.* Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. **JAMA**, 307(7):693-703, 2012.

GILLISON, M. L.; CHATURVEDI, A. K.; ANDERSON, W. F. *et al.* Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol**, 33(29):3235-3442, 2015.

GILLISON, M. L.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W. *et al.* Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst**, 100(6):407-420, 2008.

GILLISON, M. L.; KOCH, W. M.; CAPONE, R. B. *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst**, 92(9):709-720, 2000.

GILLISON, M. L.; ZHANG, O.; JORDAN, R. *et al.* Tobacco smoking and increased risk of death and progression for patients with p16-positive and p16-negative oropharyngeal cancer. **J Clin Oncol**, 30(17):2102-2111, 2012.

GOLDENBERG, D.; BEGUM, S.; WESTRA, W. H. *et al.* Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon. **Head Neck**, 30(7):898-903, 2008.

GOLDSTEIN, B. Y.; CHANG, S. C.; HASHIBE, M. *et al.* Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. **Eur J Cancer Prev**, 19(6):431-465, 2010.

GRØNHØJ LARSEN, C.; GYLDENLØVE, M.; JENSEN, D. H. *et al.* Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. **Br J Cancer**, 110(6):1587-1594, 2014.

GUHA, N.; BOFFETTA, P.; WÜNSCH FILHO, V. *et al.* Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. **Am J Epidemiol**, 166(10):1159-1173, 2007.

HA, P. K.; PAI, S. I.; WESTRA, W. H. *et al.* Real-time quantitative PCR demonstrates low prevalence of human papillomavirus type 16 in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. **Clin Cancer Res**, 8(5):1203-1209, 2002.

HAMMARSTEDT, L.; DAHLSTRAND, H.; LINDQUIST, D. *et al.* The incidence of tonsillar cancer in Sweden is increasing. **Acta Otolaryngol**, 127(9):988-992, 2007.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, 100(1):57-70, 2000.

HAUCK, F.; OLIVEIRA-SILVA, M.; DREYER, J. H. *et al.* Prevalence of HPV infection in head and neck carcinomas shows geographical variability: a comparative study from Brazil and Germany. **Virchows Arch**, 466(6):685-693, 2015.

HERBSTER, S.; FERRARO, C. T.; KOFF, N. K. *et al.* HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma: interpopulational differences, lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters. **Cancer Lett**, 326(1):52-58, 2012.

HERCEG, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. **Mutagenesis**, 22(9):91-103, 2007.

HERRERO, R.; CASTELLSAGUÉ, X.; PAWLITA, M. *et al.* Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. **J Natl Cancer Inst**, 95(23):1772-1783, 2003.

HERRERO, R.; QUINT, W.; HILDESHEIM, A. *et al.* Reduced prevalence of oral human papillomavirus (HPV) 4 years after bivalent HPV vaccination in a randomized clinical trial in Costa Rica. **PLoS One**, 8(7):e68329, 2013.

HEYN, H.; ESTELLER, M. DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges. **Nat Rev Genet**, 13(10):679-692, 2012.

HITCHMAN, S. C.; FONG, G. T. Gender empowerment and female-to-male smoking prevalence ratios. **Bull World Health Organ**, 89(3):195-202, 2011.

HOWLEY, P. M. Warts, cancer and ubiquitylation: lesions from the papillomaviruses. **Trans Am Clin Climatol Assoc**, 117:113-126, 2006.

HUBER, M. A.; TANTIWONGKOSI, B. Oral and oropharyngeal cancer. **Med Clin North Am**, 98(6):1299-1321, 2014.

IARC. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco smoke and involuntary smoking. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, 83:1-1438, 2004.

IARC. Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Alcohol consumption and ethyl carbamate. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, 96:3-1383, 2010.

INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva: **Estimativa 2012 - Incidência de câncer no Brasil**. INCA, Rio de Janeiro, 2012. 48p

INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva: **Estimativa 2018 - Incidência de câncer no Brasil**. INCA, Rio de Janeiro, 2018. 40p.

ISSA, J. P. Cancer prevention: epigenetics steps up to the plate. **Cancer Prev Res (Phila)**, 1(4):219-222, 2008.

IWAGAMI, S.; BABA, Y.; WATANABE, M. *et al.* LINE-1 hypomethylation is associated with a poor prognosis among patients with curatively resected esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Surg**, 257(3):449-455, 2013.

JAENISCH, R.; BIRD, A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nat Genet**, 33(Suppl):245-54, 2003.

JARBOE, E. A.; HUNT, J. P.; LAYFIELD, L. J. Cytomorphologic diagnosis and HPV testing of metastatic and primary oropharyngeal squamous cell carcinomas: a review and summary of the literature. **Diagn Cytopathol**, 40(6):491-497, 2012.

JONES, P. A.; BAYLIN, S. B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, 3(6):415-428, 2002.

JOURA, E. A.; GIULIANO, A. R.; IVERSEN, O. E. *et al.* A 9-valent HPV vaccine against infection and intraepithelial neoplasia in women. **N Engl J Med**, 372(8):711-723, 2015.

KAMINAGAKURA, E.; VILLA, L. L.; ANDREOLI, M. A. *et al.* High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Int J Cancer**, 130(8):1726-1732, 2012.

KATANODA K, YAKO-SUKETOMO H. Cancer mortality attributable to tobacco by selected countries based on the WHO Global Report. **Jpn J Clin Oncol**, 42(9):866, 2012.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Life (and death) in a malignant tumour. **Nature**, 379(6560):19-20, 1996.

KLUSSMANN, J. P.; MOOREN, J. J.; LEHNEN, M. *et al.* Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. **Clin Cancer Res**, 15(5):1779-1786, 2009.

KREIMER, A. R.; CHATURVEDI, A. K. HPV-associated oropharyngeal cancers – are they preventable? **Cancer Prev Res (Phila)**, 4(9):1346-1349, 2011.

LAWRENCE, M. S.; SOUGNEZ, C.; LICHTENSTEIN, L. *et al.* Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, 517(7536):576-582, 2015.

LECHNER, M.; FENTON, T. R. Advances in Genetics. **Chapter One—the genomics, epigenomics, and transcriptomics of HPV-associated oropharyngeal cancer—understanding the basis of a rapidly evolving disease.** San Diego: Academic Press, 2016. 1p.

LEWANDOWSKA, J.; BARTOSZEK, A. DNA methylation in cancer development, diagnosis and therapy – multiple opportunities for genotoxic agents to act as methylome disruptors or remediators. **Mutagenesis**, 26(4):475-487, 2011.

LEWIS, J. S. JR. p16 immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head Neck Pathol**, 6(S1):75-82, 2012.

LEWIS, J. S. JR.; KHAN, R. A.; MASAND, R. P. *et al.* Recognition of nonkeratinizing morphology in oropharyngeal squamous cell carcinoma - a prospective cohort and interobserver variability study. **Histopathology**, 60(3):427-436, 2012.

LIMA, S. C. S. **Alterações epigenéticas e suas consequências funcionais em carcinoma epidermóide de esôfago.** Tese (Doutorado) 159p. 2012 -

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA, Rio de Janeiro, 2012

LINGEN, M. W.; XIAO, W.; SCHMITT, A. *et al.* Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, 49(1):1-8, 2013.

LLERAS, R. A.; SMITH, R. V.; ADRIEN, L. R. *et al.* Unique DNA methylation loci distinguish anatomic site and HPV status in head and neck squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, 19(19):5444-5455, 2013.

LONGWORTH, M. S.; LAIMINS, L. A. Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev**, 68(2):362-372, 2004.

LOPEZ, J.; PERCHARDE, M.; COLEY, H. M. *et al.* The context and potential of epigenetics in oncology. **Br J Cancer**, 100(4):571-577, 2009.

LÓPEZ, R. V.; LEVI, J. E.; ELUF-NETO, J. *et al.* Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. **Cancer Causes Control**, 25(4):461-471, 2014.

LOPEZ-SERRA, L.; ESTELLER, M. Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. **Br J Cancer**, 98(12):1881-1885, 2008.

LOURENÇO, S. Q. C.; SCHUELER, A. F.; CAMISASCA, D. R.; *et al.* Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. **Rev Bras Cancerol**, 53(3):325-333, 2007.

LUBAMBO, S.; BEZERRA, A. M.; BRANDÃO, V. R. A. *et al.* HPV em mucosa oral normal? **Odont Clin Cientif**, 7(4):303-306, 2008.

LUI, V. W.; HEDBERG, M. L.; LI, H. *et al.* Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. **Cancer Discov**, 3(7):761-769, 2013.

LUPATO, V.; HOLZINGER, D.; HOFER, D. *et al.* Prevalence and Determinants of oral human papillomavirus infection in 500 young adults from Italy. **PLoS One**, 12(1):1-13, 2017.

MAASLAND, D. H.; VAN DEN BRANDT, P. A.; KREMER, B. *et al.* Consumption of vegetables and fruits and risk of subtypes of head-neck cancer in the Netherlands Cohort Study. **Int J Cancer**, 136(5):396-409, 2015.

MANNARINI, L.; KRATOCHVIL, V.; CALABRESE, L. *et al.* Human papilloma virus (HPV) in head and neck region: review of literature. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, 29(3):119-126, 2009.

MARUR, S.; D'SOUZA, G.; WESTRA, W. H. *et al.* HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. **Lancet Oncology**, 11(8): 781-789, 2010.

MATOS, L. L.; MIRANDA, G. A.; CERNEA, C. R. Prevalence of oral and oropharyngeal human papillomavirus infection in Brazilian population studies: a systematic review. **Braz J Otorhinolaryngol**, 81(5):554-567, 2015.

MAXWELL, J. H.; KUMAR, B.; FENG, F. Y. *et al.* Tobacco use in human papillomavirus-positive advanced oropharynx cancer patients related to increased risk of distant metastases and tumor recurrence. **Clin Cancer Res**, 16(4):1226-1235, 2010.

MCKEAN-COWDIN, R.; FEIGELSON, H. S.; ROSS, R. K. *et al.* Declining cancer rates in the 1990s. **J Clin Oncol**, 18(11):2258-2268, 2000.

MEHANNA, H.; BEECH, T.; NICHOLSON, T. *et al.* The prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer:

Systematic review and meta-analysis of trends by time and region. **Head Neck**, 35(5):747-755, 2013.

MEHANNA, H.; JONES, T. M.; GREGOIRE, V. *et al.* Oropharyngeal carcinoma related to human papillomavirus. **BMJ**, 340:c1439, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p.

MISIUKIEWICZ, K.; CAMILLE, N.; GUPTA, V. *et al.* The role of HPV status in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clin Adv Hematol Oncol**, 12(12):812-819, 2014.

MITRA, A.; MACINTYRE, D. A.; LEE, Y. S. *et al.* Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with increased vaginal microbiome diversity. **Sci Rep**, 5(16865):1-11, 2015.

MOORE, K. A.; MEHTA, V. The growing epidemic of HPV-positive oropharyngeal carcinoma: a clinical review for primary care providers. **J Am Board Fam Med**, 28(4):498-503, 2015.

MUÑOZ, N.; CASTELLSAGUÉ, X.; DE GONZÁLEZ, A. B. *et al.* HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, 24(S3):1-10, 2006.

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEN, C. M. *et al.* **Patologia oral e maxilofacial**. 4. ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 331p.

NOTTA, F.; CHAN-SENG-YUE, M.; LEMIRE, M. *et al.* A renewed model of pancreatic cancer evolution based on genomic rearrangement patterns. **Nature**, 538(7625): 378-382, 2016.

O'SULLIVAN, B.; HUANG, S. H.; SU, J. *et al.* Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal Cancer Network for Staging (ICON-S): a multicenter cohort study. **Lancet Oncol**, 17(4):440-451, 2016.

OGINO, S.; NOSHO, K.; KIRKNER, G. J. *et al.* A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer. **J Natl Cancer Inst**, 100(23):1734-1738, 2008.

PARFENOV, M.; PEDAMALLU, C. S.; GEHLENBORG, N. *et al.* Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 111(43):15544-15549, 2014.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J. *et al.* Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**, 55(2):74-108, 2005.

PATTAMADILOK, J.; HUAPAI, N.; RATTANATANYONG, P. *et al.* LINE-1 hypomethylation level as a potential prognostic factor for epithelial ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer**, 18(4):711-777, 2008.

PICKERING, C. R.; ZHANG, J.; YOO, S. Y. *et al.* Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. **Cancer Discov**, 3(7):770-781, 2013.

PIÑA, A. R.; JIMENEZ, L. S.; MARIANO, F. V. *et al.* Human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from Guatemala and Brazil. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, 121(4):412-418, 2016.

POAGE, G. M.; HOUSEMAN, E. A.; CHRISTENSEN, B. C. *et al.* Global hypomethylation identifies loci targeted for hypermethylation in head and neck cancer. **Clin Cancer Res**, 17(11):3579-3589, 2011.

POSNER, M. R.; LORCH, J. H.; GOLOUBEVA, O. *et al.* Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial. **Ann Oncol**, 22(5):1071-1077, 2011.

PUBMED. **Gene**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>> Acesso em: 08 de março de 2018.

PYEON, D.; PEARCE, S. M.; LANK, S. M. *et al.* Establishment of human papillomavirus infection requires cell cycle progression. **PloS Pathog**, 5(2):1-9, 2009.

RAGIN, C. C. R.; TAIOLI, E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: Review and meta-analysis. **Int J Cancer**, 121(8):1813-1820, 2007.

REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, 447(7143):425-432, 2007.

RETTIG, E. M.; D'SOUZA, G. Epidemiology of head and neck cancer. **Surg Oncol Clin N Am**, 24(3):379-396, 2015.

RIBEIRO, K. B.; LEVI, J. E.; PAWLITA, M. *et al.* Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case–control studies in high-incidence regions. **Int J Epidemiol**, 40:(2)489-502, 2011.

RICHARDS, K. L.; ZHANG, B.; BAGGERLY, K. A. *et al.* Genome-wide hypomethylation in head and neck cancer is more pronounced in HPV-negative tumors and is associated with genomic instability. **PLoS One**, 4(3):e4941, 2009.

RIVERO, E. R. C.; NUNES, F. D. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. **Brazilian Oral Research**, 20(1):21-24, 2006.

ROBERTS, J. N.; KINES, R. C.; KATKI, H. A. *et al.* Effect of Pap smear collection and carrageenan on cervicovaginal human papillomavirus-16 infection in a rhesus macaque model. **J Natl Cancer Inst**, 103(9):737-743, 2011.

ROBINSON, K. L.; MACFARLANE, G. J. Oropharyngeal cancer incidence and mortality in Scotland: are rates still increasing? **Oral Oncol**, 39(1):31-36, 2003.

ROCHA, D. A. P.; SOUZA, L. B.; PINTO, L. P. Análise comparativa da proliferação celular entre carcinomas de células escamosas orais HPV-positivos e HPV-negativos. **J Bras Patol Med Lab**, 43(4):269-274, 2007.

ROMÁN-GÓMEZ, J.; JIMÉNEZ-VELASCO, A.; AGIRRE, X. *et al.* CpG island methylator phenotype redefines the prognostic effect of t(12;21) in childhood acute lymphoblastic leukemia. **Clin Cancer Res**, 12(16):4845-4850, 2006.

SAITO, K.; KAWAKAMI, K.; MATSUMOTO, I. *et al.* Long interspersed nuclear element 1 hypomethylation is a marker of poor prognosis in stage IA non-small cell lung cancer. **Clin Cancer Res**, 16(8):2418-2426, 2010.

SANTOS-SILVA, A. R.; RIBEIRO, A. C.; SOUBHIA, A. M. *et al.* High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. **Histopathology**, 58(7):1127-1135, 2011.

SARTOR, M. A.; DOLINOY, D. C.; JONES, T. R. *et al.* Genome-wide methylation and expression differences in HPV (+) and HPV (-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. **Epigenetics**, 6(6):777-787, 2011.

SAWAN, C.; VAISSIÈRE, T.; MURR, R. *et al.* Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. **Mutat Res**, 642(1-2):1-13, 2008.

SCHACHE, A. G.; LILOGLOU, T.; RISK, J. M. *et al.* Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. **Clin Cancer Res**, 17(19):6262-6271, 2011.

SCHWARTZ, S. M.; DALING, J. R.; DOODY, D. R. *et al.* Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. **J Natl Cancer Inst**, 90(21):1626-1636, 1998.

SCUDELLARI, M. HPV: sex, cancer and a virus. **Nature**, 503(7476):330-332, 2013.

SGARAMELLA, N.; COATES, P. J.; STRINDLUND, K. *et al.* Expression of p16 in squamous cell carcinoma of the mobile tongue is independent of HPV infection despite presence of the HPV receptor syndecan-1. **Br J Cancer**, 113(2):321-326, 2015.

SHIGAKI, H.; BABA, Y.; WATANABE, M. *et al.* LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis. **Gastric Cancer**, 16(4):480-487, 2013.

SIGALOTTI, L.; COVRE, A.; FRATTA, E. *et al.* Whole genome methylation profiles as independent markers of survival in stage IIIC melanoma patients. **J Transl Med**, 10(185):1-11, 2012.

SIGALOTTI, L.; FRATTA, E.; BIDOLI, E. *et al.* Methylation levels of the “long interspersed nucleotide element-1” repetitive sequences predict survival of melanoma patients. **J Transl Med**, 9(78):1-10, 2011.

SLADE, T.; CHAPAN, C.; SWIFT, W. *et al.* Birth cohort trends in the global epidemiology of alcohol use and alcohol related harms in men and women: systematic review and meta regression. **BMJ Open**, 6(10):1-12, 2016.

SOUTO, R.; FALHARI, J. P. B.; CRUZ, A. D. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Rev Bras Cancerol**, 51(2):155-60, 2005.

SOUZA, T. R. B.; GONÇALVES, A. J. Papilomavírus humano e a detecção do DNA viral no carcinoma espinocelular da cavidade oral. **Rev Bras Cir Cabeça Pescoço**, 38(1):62-66, 2009.

STERN, C. D.; CONRAD, H. Waddington's contributions to avian and mammalian development, 1930-1940. **Int J Dev Biol**, 44(1):15-22, 2000.

STRAETMANS, J. M.; OLTROFF, N.; MOOREN, J. J. *et al.* Human papillomavirus reduces the prognostic value of nodal involvement in tonsillar squamous cell carcinomas. **Laryngoscope**, 119(10):1951-1957, 2009.

STRANSKY, N.; EGLOFF, A. M.; TWARD, A. D. *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. **Science**, 333(6046):1157-1160, 2011.

STURGIS, E. M.; ANG, K. K. The epidemic of HPV-associated oropharyngeal cancer is here: is it time to change our treatment paradigms? **J Natl Compr CancNetw**, 9(6):665-673, 2011.

THAVARAJ, S.; STOKES, A.; GUERRA, E.; *et al.* Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. **J Clin Pathol**, 64(4):308-312, 2011.

THOMAS, J.; PRIMEAUX, T. Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? **Ann Diagn Pathol**, 16(2):91-99, 2012.

TOVAR, J. M.; BAZALDUA, O. V.; VARGAS, L. *et al.* Human papillomavirus, cervical cancer, and the vaccines. **Postgraduate Medicina**, 120(2):79-84, 2008.

VAN HOESEL, A. Q.; VAN DE VELDE, C. J.; KUPPEN, P. J. *et al.* Hypomethylation of LINE-1 in primary tumor has poor prognosis in young breast cancer patients: a retrospective cohort study. **Breast Cancer Res Treat**, 134(3):1103-1114, 2012.

VAN KEMPEN, P. M.; NOORLAG, R.; BRAUNIUS, W. W. *et al.* Differences in methylation profiles between HPV-positive and HPV-negative oropharynx squamous cell carcinoma: a systematic review. **Epigenetics**, 9(2):194-203, 2014.

VAN MONSJOU, H. S.; BALM, A. J.; VAN DEN BREKEL, M. M. *et al.* Oropharyngeal squamous cell carcinoma: a unique disease on the rise? **Oral Oncol**, 46(11):780-785, 2010.

VAN MONSJOU, H. S.; SCHAAPVELD, M.; VAN DEN BREKEL, M. W. *et al.* The epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma in The Netherlands during the era of HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. Is there really evidence for a change? **Oral Oncol**, 51(10):901-907, 2015.

VIRMANI, A. K.; MULLER, C.; RATHI, A. *et al.* Aberrant methylation during cervical carcinogenesis. **Clin Cancer Res**, 7(3):584-589, 2001.

VOKES, E. E.; AGRAWAL, N.; SEIWERT, T. Y. HPV-associated head and neck cancer. **J Natl Cancer Inst**, 107(12):1-7, 2015.

WARNAKULASURIYA, S. Causes of oral cancer - an appraisal of controversies. **Br Dent J**, 207(10):471-475, 2009.

WARNAKULASURIYA, S.; DIETRICH, T.; BORNSTEIN, M. M. *et al.* Oral health risks of tobacco use and effects of cessation. **Int Dent J**, 60(1):7-30, 2010.

WEINBERGER, P. M.; YU, Z.; HAFFTY, B. G. *et al.* Molecular Classification Identifies a Subset of Human Papillomavirus – Associated Oropharyngeal Cancers With Favorable Prognosis. **J Clin Oncol**, 24(5):736-747, 2006.

WESTRA, W. H. Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. **Oral Oncol**, 50(9):771-779, 2014.

WESTRA, W. H. The pathology of HPV-related head and neck cancer: implications for the diagnostic pathologist. **Semin Diagn Pathol**, 32(1):42-53, 2005.

WIRTH, L. J. Cetuximab in human papillomavirus-positive oropharynx carcinoma. **J Clin Oncol**, 34(12):1289-1291, 2016.

WOLFFE, A. P.; MATZKE, M. A. Epigenetics: regulation through repression. **Science**, 286(5439):481-486, 1999.

WOODMAN, C. B.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer**, 7(1):11-22, 2007.

WRIGHT, G.; MORGAN, M. Y. Alcohol and tobacco misuse: reducing aerodigestive cancer risk. **World J Hepatol**, 5(8):452-457, 2013.hauck

XIAO-JIE, L.; HUI-YING, X.; QI, X. *et al.* LINE-1 in cancer: multifaceted functions and potential clinical implications. **Genet Med**, 18(5):431-439, 2016.

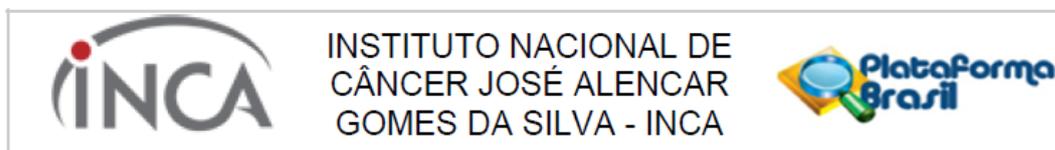
ZAKHARI, S. Alcohol metabolism and epigenetics changes. **Alcohol Res**, 35(1):6-16, 2013.

ZHAO, M.; ROSENBAUM, E.; CARVALHO, A. L. *et al.* Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. **Int J Cancer**, 117(4):605-610, 2005.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer**, 2(5):342-350, 2002.

8 ANEXOS

8.1 PARECER DO CEP - INCA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: VALIDAÇÃO DE BIOMARCADORES PROGNÓSTICOS E CLASSIFICADORES DE TRATAMENTO PARA O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE

Pesquisador: Simone de Queiroz Chaves Lourenço

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60480316.0.0000.5274

Instituição Proponente: Coordenação de Pesquisa

Patrocinador Principal: Coordenação de Pesquisa
FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.858.447

Apresentação do Projeto:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 1.786.733, datado de 21 de outubro de 2016.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 1.786.733, datado de 21 de outubro de 2016.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 1.786.733, datado de 21 de outubro de 2016.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 1.786.733, datado de 21 de outubro de 2016.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 1.786.733, datado de 21 de outubro de 2016.

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 1.858.447

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conforme descrito no Parecer Consubstanciado do CEP-INCA de número 1.786.733, datado de 21 de outubro de 2016:

1. Quanto à folha de rosto:

1.1. O campo "Patrocinador principal" foi parcialmente preenchido. Não foi assinado e datado. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: "O campo foi devidamente preenchido, datado e assinado. Tal documento será anexado junto a resposta a este parecer consubstanciado do CEP - INCA na Plataforma Brasil".

ANALISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

2. Quanto ao projeto de pesquisa:

2.1. De acordo com o item "População de estudo", "Estima-se coletar uma coorte de cerca de 400 casos de câncer de orofaringe...", porém, não há esclarecimentos sobre este tamanho amostral (cálculo/conveniência). Solicita-se adequação.

RESPOSTA: "Esta informação foi então inserida no projeto - na página 7 do PROJETO dentro do primeiro parágrafo do item METODOLOGIA".

ANALISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

2.2. Descrever em protocolo a origem do material biológico a ser avaliado, como o mesmo será coletado, como será o transporte destas amostras ao laboratório responsável pela análise, assim como a sua guarda. Tais informações são conteúdos constitutivos do Regulamento/Regimento de Biorrepositório, o qual deve ser apresentado a este Comitê. O regimento pode ser apresentado no corpo do protocolo ou como declaração. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: "Tais informações foram demonstradas através da declaração do Regimento de Biorrepositório. Tal documento será anexado junto a resposta a este parecer consubstanciado do

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER JOSÉ ALENCAR
GOMES DA SILVA - INCA



Continuação do Parecer: 1.858.447

CEP - INCA na Plataforma Brasil".

ANALISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

2.3. No projeto há as seguintes frases: "Os resultados permitirão avaliarmos em que momento da transição epidemiológica os brasileiros se encontram..." e "Em uma amostragem de tumores de orofaringe de pacientes do Brasil pretende-se...". Tais frases remetem a uma generalização dos achados da pesquisa à nível de "Brasil", porém, de acordo com a PB o estudo é unicêntrico, com dados exclusivos do INCA (RJ). Solicita-se adequação.

RESPOSTA: "Os termos foram devidamente corrigidos, sendo inserido que o estudo refere-se a população do Instituto Nacional de Câncer - Rio de Janeiro/Brasil - na página 2 do PROJETO no item RESUMO e na página 5 do PROJETO no item OBJETIVOS SECUNDÁRIOS".

ANALISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

2.4. O Anexo 1 apresentado - a ficha clínica - possui o número de matrícula e nome do paciente. Atentar-se para confidencialidade dos dados dos participantes. O pesquisador deve prever procedimentos que assegurem a confidencialidade e a privacidade dos dados, tais como codificação dos participantes. Na Ficha de coleta de dados não poderá haver quaisquer informações (nome, CPF, número de cadastro na instituição, endereço, etc.) que permita a identificação dos participantes da pesquisa. Estes deverão ser registrados em ordem numérica crescente e a relação com os dados de seu registro apresentados em separado do protocolo (e não anexados), de acesso exclusivo do Pesquisador Principal, garantindo assim o sigilo. Solicita-se adequação. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: "Os campos foram devidamente removidos, sendo inserido apenas um campo para a codificação do paciente - na página 16 do PROJETO no item ANEXO 1".

ANALISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 1.858.447

3. Quanto ao Orçamento:

3.1. De acordo com o item "Metodologia" do projeto, esta pesquisa tem financiamento da FAPERJ e CNPq, entretanto, nas informações básicas da PB foram registrados a Coordenação de Pesquisa do INCA e a FAPERJ. Esclarecer e ajustar as discrepâncias apresentadas.

RESPOSTA: "O financiamento do projeto será da FAPERJ e da Coordenação de Pesquisa do INCA, o CNPq foi citado erroneamente, este termo foi removido e inserido o patrocinador adequado - página 6 do PROJETO dentro do primeiro parágrafo do item METODOLOGIA".

ANALISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

4. Em relação as Informações básicas na PB:

4.1. Foi registrado a resposta "não" para o questionamento "Haverá retenção de amostras para armazenamento em banco?". Entretanto, de acordo com a descrição metodológica do projeto haverá guarda temporária das amostras biológicas no Laboratório do Programa de Carcinogênese Molecular do Centro de Pesquisas (CPQ) do INCA, ou seja, Biorrepositório. Observe os documentos necessários para armazenamento de material biológico humano em biorrepositório atrelado a um projeto de pesquisa específico conforme a Resolução CNS 441/11, itens 2.II e 6, Portaria MS 2.201/11, Capítulo II, Artigos 5º e Capítulo III, Artigo 8 e Norma Operacional CNS Nº 001/2013 anexo II. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: "Tal informação foi corrigida junto a Plataforma Brasil, pois haverá armazenamento de amostras em banco, caracterizando Biorrepositório"

ANALISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

4.2. A hipótese apresentada não se caracteriza como tal. Foram apresentadas afirmativas sobre o tema e possíveis benefícios do estudo. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: "Esta orientação foi acatada e realizada a alteração no texto junto a Plataforma Brasil".

ANALISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

5. Quando ao TCLE:

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



Continuação do Parecer: 1.858.447

5.1. De acordo com a Resolução 466/12 o TCLE deve conter linguagem acessível, que permita o fácil entendimento pelo participantes de pesquisa. Desta forma, solicita-se a substituição ou esclarecimento das seguintes palavras/expressões: "incidência", "transição epidemiológica" e "MSc"

RESPOSTA: "As seguintes expressões foram alteradas"

ANALISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_548336.pdf	21/11/2016 01:58:02		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Resposta_ao_PARECER_CONSUBSTANCIADO_DO_CEP.docx	21/11/2016 01:57:27	Simone de Queiroz Chaves Lourenço	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_versao01.doc	21/11/2016 01:56:13	Simone de Queiroz Chaves Lourenço	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_versao01.pdf	20/11/2016 23:58:38	Simone de Queiroz Chaves Lourenço	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Regimento_Biorrepositorio_Projeto_versao01.doc	20/11/2016 23:56:42	Simone de Queiroz Chaves Lourenço	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_versao01.doc	20/11/2016 23:56:15	Simone de Queiroz Chaves Lourenço	Aceito
Declaração do Patrocinador	FAPERJ.pdf	27/09/2016 16:26:13	Simone de Queiroz Chaves Lourenço	Aceito
Orçamento	Orcamento.doc	27/09/2016	Simone de Queiroz	Aceito

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER JOSÉ ALENCAR
GOMES DA SILVA - INCA



Continuação do Parecer: 1.858.447

Orçamento	Orcamento.doc	14:47:47	Chaves Lourenço	Aceito
Outros	Formulario_para_submissao.pdf	27/09/2016 14:33:59	Simone de Queiroz Chaves Lourenço	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracoes_da_pesquisadora.pdf	27/09/2016 14:31:39	Simone de Queiroz Chaves Lourenço	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaracoes_de_formacao_de_biorrepositorio.pdf	27/09/2016 14:30:45	Simone de Queiroz Chaves Lourenço	Aceito
Cronograma	Cronograma.doc	27/09/2016 14:28:19	Simone de Queiroz Chaves Lourenço	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 09 de Dezembro de 2016

Assinado por:

Carlos Henrique Debenedito Silva
(Coordenador)

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br

8.2 APOIO FINANCEIRO - APQ1 FAPERJ



FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

F A P E R J	
Processo n.º	
Data: ___/___/___	Fls.: ___
Rubrica:	

Formulário de Inscrição

Edital: APQ1 - Auxílio à Pesquisa básica - 2014/2

Solicitante: Simone de Queiroz Chaves Lourenço

Pedido: 208538

Instituição:	Universidade Federal Fluminense		
Unidade:	Faculdade de Odontologia		
Departamento:	Patologia		
CEP:	24220-900		
Endereço:	UFF - Universidade Federal Fluminense	Número:	9
Complemento:	3 Andar	Bairro:	Icaraí
Município:	Niterói	UF:	RJ
Telefone:	21 2629900	Ramal:	9803
Pais:	Brasil		
Área			
Grande Área	Área	Sub Área	
Ciências da Saúde	Odontologia	Clínica Odontológica	
Área/Setor Principal			
Clínica Odontológica			
Tema			Principal
Faixa:			

Dados Gerais

Dados Gerais
Título
AVALIAR A IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE NA INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DO HPV
Resumo estruturado para divulgação
Introdução: O câncer de orofaringe teve um aumento de sua incidência em alguns países ao longo dos últimos 20 anos. O carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEO) representa 90 a 95% desses tumores, representando um desafio no controle e tratamento oncológico. Este aumento tem sido atribuído, em especial, ao Papilomavírus Humano (HPV). Observou-se uma transição epidemiológica nos países desenvolvidos que impactou no perfil dos pacientes com CCEO, deixando de ser tabagistas, etilistas e de baixa renda e passaram ter como agente etiológico a infecção por HPV, apresentar idade mais precoce e melhor prognóstico. No Brasil, esta situação ainda não está definida. Objetivo: Investigar a presença de HPV através da imunomarcagem da proteína p16 em carcinomas de células escamosas de orofaringe numa população brasileira. Material e Métodos: Estudo retrospectivo e descritivo de 400 pacientes com diagnóstico de CCEO, entre 01 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2010 do Instituto Nacional de Câncer. Os dados sócio-demográficos e clínico-patológicos da população de estudo serão coletados e armazenados em um banco de dados. As informações a respeito de óbito, recorrência local, presença de segundo tumor primário, metástase regional e à distância serão coletadas e a sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida específica calculadas. As lâminas contendo cortes corados em HE serão avaliadas com aplicação da gradação histopatológica da OMS (BARNES et al., 2005) e Avaliação Histopatológica de Risco (AHR) proposta por BRÄNDWEIN-GENSLER et al. (2005) A reação de imuno-histoquímica para a proteína p16 será realizada utilizando o CINtec Histology kit no sistema de automação Ventana Benchmark Autostainer. O tumor será considerado positivo para p16 com forte e difusa marcação nuclear e citoplasmática presente em mais de 70% das células neoplásicas. Perspectivas: Os resultados dessa primeira parte do estudo direcionarão as avaliações seguintes de identificação e caracteriz
Introdução

FAPERJ	
Processo n.º	
Data: ___/___/___	Fls.: ___
Rubrica:	

A incidência de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) tem aumentado nas últimas três décadas (KOWALSKI & SANABRIA, 2007). É a quinta principal causa de câncer em incidência e a sexta principal causa de morte por câncer do mundo (GOON et al., 2009). Aproximadamente 570.000 novos casos de CCECP são diagnosticados anualmente em todo o mundo, representando 5% de todos os tumores (RIBEIRO et al., 2011). O CCECP é uma doença atribuída a exposições ambientais (GILLISON et al., 2000). Os carcinomas de células escamosas da orofaringe (CCEO) são categorizados como carcinomas de células escamosas (CCE) de cabeça e pescoço, juntamente com carcinoma de células escamosas de boca, laringe e hipofaringe (GILLISON et al., 2000; BABOCI et al., 2013). O CCEO apresenta cerca de 50.000 casos incidentes (FERLAY et al., 2010; VAN MONSJOU et al., 2010), e juntamente com carcinomas de células escamosas da hipofaringe eles representam cerca de 1,1% de toda a malignidade do mundo (FERLAY et al., 2010). O uso do tabaco e o consumo de álcool são fatores de risco bem estabelecido, mas recentemente a infecção por HPV tem sido identificada como um agente etiológico para esses cânceres, especialmente na orofaringe, incluindo base de língua e tonsila (HERRERO et al., 2003; CHATURVEDI et al., 2011; ANANTHARAMAN et al., 2013). Há aproximadamente três anos, a participação do papilomavírus humano (HPV) no carcinoma cervical foi postulada. Hoje, está bem estabelecido como família de vírus heterogênea, como importante agente carcinogênico biológico em humanos, causando não somente a grande maioria dos tumores cervicais e ano-genitais, mas também um número variável de cânceres em outros locais do corpo humano incluindo cabeça e pescoço (MANNARINI et al., 2009). Observou-se uma transição epidemiológica nos países desenvolvidos que impactou no perfil dos pacientes com CCEO, deixando de ser tabagistas, etilistas e de baixa renda e passaram ter como agente etiológico a infecção por HPV, apresentar idade mais precoce e melhor prognóstico (EVANS, M. et al., 2013). No Brasil, ainda faltam informações sobre a ocorrência dessa transição epidemiológica ocorrida nos países desenvolvidos (INCA, 2012). Somente a presença de HPV não é suficiente para o desenvolvimento de neoplasia. Os co-fatores genéticos e outros ambientais parecem ser necessários para o desenvolvimento do carcinoma. A expressão de oncogenes E6 e E7 do HPV-16 produz aneuploidia cromossômica, favorecendo a integração de genomas do HPV de alto risco nos cromossomas de células normais (BRINEZ et al., 2007). Um aspecto a ser destacado é a existência de outros carcinógenos que atuam sobre o epitélio de revestimento da mucosa, dentre eles, assumem importante destaque aqueles provenientes do tabaco e o produto metabólico do etanol - o acetaldeído, que pela potência e frequência, têm uma ação oncogênica comprovada sobre o epitélio, dificultando ainda mais o estudo sobre a ação do HPV (SCULLY, 2002; OLIVEIRA et al., 2003). O HPV é encontrado em aproximadamente 20% de todos os CCECP e em 50-85% dos CCEO (D'SOUZA et al., 2010). Entretanto, a maioria (> 90%) dos CCECP associados ao HPV é causada pelo tipo HPV 16, o mesmo que leva ao câncer ano-genital associado ao HPV (MARUR et al., 2010; D'SOUZA et al., 2010; KREIMER et al., 2005; SINGHI & WESTRA, 2010). Atualmente, existem dados moleculares e epidemiológicos suficientes que sugerem um significado etiopatogênico do HPV em CCECP (AL-SWIAHB et al., 2011). Os tumores HPV positivo (+) e HPV negativo (-) representam diferentes entidades clinicopatológicas e moleculares, pois possuem diferentes incidências, etiologias, idades, sítios de predileção e prognósticos (LEEMANS et al., 2011; SNOW & LAUDADIO, 2010; GILLISON, 2006; D'SOUZA et al., 2010). Os tumores HPV positivos possuem tipicamente o TP53 do tipo selvagem (não mutado), a presença e o tipo de mutação do TP53 tem relevância prognóstica sendo observado que tumores com mutações no TP53 apresentam pior comportamento (LEEMANS et al., 2011; LICITRA et al., 2006). O CCECP associado ao HPV parece ser uma entidade clínica distinta, tendo melhor prognóstico que os tumores HPV negativos, em parte, devido ao aumento da sensibilidade do câncer à quimioterapia e radioterapia (MARUR et al., 2010; FAKHRY et al., 2008; LICITRA et al., 2006). Quando comparados com os carcinomas de células escamosas HPV negativos, os casos positivos têm forte imunexpressão da proteína p16, um componente da via supressora do tumor retinoblastoma. A expressão do p16 é intensa e difusamente identificada em tumores associados ao HPV, mas ausente em carcinomas HPV negativos. Casos que são HPV positivos, mas negativos para a expressão de p16, são mais similares aos casos HPV negativos em nível molecular, sugerindo que, nesses casos, o HPV não está diretamente envolvido na carcinogênese (SNOW & LAUDADIO, 2010; LICITRA et al., 2006). São vários os métodos de biologia molecular utilizados atualmente para a detecção do HPV, que podem ser classificados de acordo com sua sensibilidade (PIVA et al., 2008). Entre as técnicas utilizadas temos a reação em cadeia da polimerase (PCR), que pode identificar tipos específicos de HPV com o uso de iniciadores específicos ou posterior digestão por enzimas de restrição; a análise por PCR em tempo real para quantificar a carga viral; a hibridização in situ, que permite também a identificação da presença e a tipagem com o uso de sondas específicas; a detecção de anticorpos dirigidos contra epitopos do HPV e a detecção por imuno-histoquímica de biomarcadores relacionados (por exemplo: a proteína p16) (MARUR et al., 2010). A PCR tem a vantagem de sensibilidade com a capacidade de detectar pelo menos uma cópia do genoma viral por célula. O uso de hibridização in situ e de imuno-histoquímica oferecem vantagens em termos de acesso, custo e tempo de trabalho. Vários estudos têm comparado as técnicas na tentativa de otimizar e validá-las na detecção do HPV (SNOW & LAUDADIO, 2010). A incidência de CCE de boca tem diminuído nos últimos anos em muitas partes do mundo, de acordo com declínio no uso do tabaco (FRANCESCHI et al., 2000). Em contraste, a incidência CCEO tem aumentado ao longo dos últimos 20 anos em vários países, incluindo Austrália, Canadá, Holanda, Estados Unidos e Reino Unido. Esses padrões de incidência divergentes levam à hipótese de uma exposição diferente ao tabaco e talvez a infecção por HPV, sejam responsáveis pelo aumento da incidência do CCEO (GILLISON et al., 2012; CHATURVEDI et al., 2013). Recentes publicações demonstraram que alguns biomarcadores como o HPV, p53, Bcl-2, EGFR e CA-9 apresentam impacto no prognóstico do CCEO (NGUYEN et al., 2010; FELLER et al., 2010). Na população brasileira não há estudos recentes que investigaram a incidência do CCEO e apesar da introdução de novos tratamentos a sobrevida de pacientes diagnosticados com esse tumor permanece baixa (CHERNOK et al., 2009; FISCHER et al., 2010). O entendimento dessa transição epidemiológica tem impacto direto sobre o tratamento do CCEO, com considerável efeito sobre a qualidade de vida e a reabilitação social dos pacientes, além dos custos terapêuticos. A caracterização dos CCEO

FAPERJ	
Processo n.º	
Data: ___/___/___	Fls.: ___
Rubrica:	

associados ao HPV em diferentes regiões do mundo pode direcionar importantes medidas na prevenção, potencialmente através da vacinação do HPV profilática e política de vacinação masculina (CHATURVEDI et al., 2013).

Objetivos

OBJETIVO PRINCIPAL Investigar a presença do HPV através da imunomarcagem da proteína p16 em carcinomas de células escamosas de orofaringe numa população brasileira. **OBJETIVOS SECUNDARIOS** 1. Avaliar por imunohistoquímica a proteína p16 para investigação da presença do HPV no CCEO; 2. Associar os resultados imunohistoquímicos identificados nos tumores com os dados clínico-patológicos da população de estudo; 3. Associar os resultados imunohistoquímicos obtidos com recidivas, acometimento de linfonodos e sobrevida.

Justificativas

O câncer de orofaringe apresenta alta incidência no âmbito nacional e internacional e em contraste com outras neoplasias seu prognóstico não tem melhorado significativamente nas últimas décadas. Um biomarcador confiável de comportamento de alto risco para CCEO ainda permanece indefinido. Estudos mais recentes, realizados nos Estados Unidos e Europa, descreveram a implicação do HPV na etiopatogenia de alguns casos de CCEO separando essa neoplasia em dois grupos - HPV positivos e negativos - que parecem distintos na evolução e comportamento da doença. Entender a transição epidemiológica do CCEO no Brasil, através da investigação da participação do HPV em tumores de uma população de brasileiros mostra-se extremamente relevante. Esses achados poderão refletir em mudanças de protocolos terapêuticos, inclusão de medidas preventivas e melhorias na qualidade de vida desses pacientes.

Metas

- Ampliar o conhecimento na etiopatogenia do CCEO; - A partir dos resultados obtidos com a expressão da proteína p16 prosseguir investigação para confirmar e caracterizar a presença do vírus HPV por PCR e hibridização in situ; - Estabelecer a presença do HPV no CCEO da população brasileira; - Possibilitar a comparação do perfil do CCEO no Brasil com o Reino Unido e Estados Unidos; - Correlacionar os dados sócio-demográficos, clínico-patológicos e imunopositividade de proteína p16 com tratamento e desfecho dos pacientes; - Discutir trabalhos publicados relacionados ao tema e apresentar resultados obtidos nos experimentos em reuniões científicas do grupo de pesquisa; - Apresentar os resultados desse estudo em fóruns científicos nacionais e internacionais, além da publicação em revistas de alto impacto.

Método

FAPERJ	
Processo n.º _____	
Data: ____/____/____	Fls.: ____
Rubrica: _____	

Esse estudo está sendo desenvolvido em parceria entre a Universidade Federal Fluminense, Universidade do Estado do Rio de Janeiro e o Instituto Nacional do Câncer onde participarão alunos de graduação, doutorando e pesquisadores das respectivas instituições. Este projeto de pesquisa tem aprovação no Comitê de Ética do INCA sob o número de registro 116/11. Os experimentos serão realizados no Laboratório do Programa de Carcinogênese Molecular do Centro de Pesquisas (CPQ) do INCA, no Laboratório de Biotecnologia Aplicada – LABA (Setor Histologia) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense (UFF) e no Laboratório de Toxicologia e Oncologia Molecular, Departamento de Bioquímica da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ). População de estudo Estudo observacional retrospectivo e descritivo composto por 400 pacientes com diagnóstico de CCEO, entre 01 de janeiro de 1999 a 31 de dezembro de 2010 no Instituto Nacional de Câncer. Serão aplicados os seguintes critérios para a seleção da população de estudo: Pacientes >18 anos de idade com tumores primários de orofaringe em qualquer estadiamento clínico; com diagnóstico confirmado de CCEO por exame histopatológico; com pelo menos 3 anos de seguimento a partir do momento do diagnóstico. Serão excluídos os pacientes cujos blocos de parafina representativos do tumor não estiverem disponíveis ou não apresentarem material representativo do tumor ou mal conservado. Os dados sócio-demográficos e clínico-patológicos da amostra selecionada serão coletados dos prontuários e armazenados em um banco de dados. Dos prontuários de cada paciente da amostra serão compiladas informações como gênero, idade, tabagismo, etilismo, estadiamento clínico (cTNM), estadiamento patológico (pTNM), localização do tumor, dados referentes ao tratamento e ao acompanhamento bem como informações sobre os aspectos macro e microscópicos dos CCEO (ANEXO 1). As informações a respeito de óbito, recorrência local, presença de segundo tumor primário, metástase regional e à distância serão coletadas e a sobrevida global, sobrevida livre de doença e sobrevida específica calculadas. Análise Histopatológica As lâminas contendo cortes corados em HE serão avaliadas por três patologistas (LAB; VGB; SQCL), de forma independente, após período de calibração, utilizando-se um microscópio de óptico de luz (Nikon Labophot 2, Tóquio, Japão) para aplicação da gradação histopatológica da OMS (BARNES et al., 2005) e Avaliação Histopatológica de Risco (AHR) proposta por BRANDWEIN-GENSLER et al. (2005) (BRANDWEIN-GENSLER et al., 2010; CAMISASCA et al., 2011; LINDENBLATT et al., 2012). Em caso de discordâncias, as lâminas serão reavaliadas em conjunto. Reação de Imuno-histoquímica p16 A imuno-histoquímica para a proteína p16 será realizada utilizando o CINtec Histology kit (mtm Laboratories, AG, Germany) num valor de referência ao sistema de automação Ventana Benchmark Autostainer. Um CCE de tonsila com expressão elevada de p16 será utilizada como um controle positivo e o anticorpo primário será omitido dos controles negativos. O tumor será considerado positivo para p16 na presença de uma forte e difusa marcação nuclear e citoplasmática presente em mais de 70% das células neoplásicas. Todos os outros padrões encontrados serão classificados como negativos. (EVANS et al., 2013). Em seguimento, os casos positivos para proteína p16 serão investigados quanto a presença e tipo do vírus HPV por hibridização in situ e PCR. Análise Estatística As descrições estatísticas das características colhidas nos prontuários serão apresentadas através de proporções, médias e medidas de variabilidade (desvio padrão e erro padrão), conforme a natureza das variáveis. As informações sócio-demográficas e clínico-patológicas dos pacientes com CCEO serão registradas e armazenadas numa planilha do Microsoft Excel® e num banco de dados elaborado no software Epi Info versão 3.5.1 para Windows. A análise estatística será feita com auxílio do software SPSS (Statistic Package for Social Sciences) versão 17.0. Para avaliar a associação entre as variáveis sócio-demográficas e clínico-patológicas da população de estudo com os resultados imuno-histoquímicos serão utilizado o teste exato de Fisher ou o teste do Qui-quadrado. A sobrevida global, a sobrevida livre de doença e a sobrevida específica serão calculadas para verificar o valor preditivo das variáveis histopatológicas e imuno-histoquímicas do estudo. O estudo da sobrevida utilizará a análise de Kaplan-Meier e o teste Log rank para comparação das curvas. Em ambas as análises, quando não houver o evento do interesse, os casos serão considerados censurados. As decisões estatísticas serão tomadas ao nível de significância de 0,05.

Resultados Esperados

- Estabelecer a participação ou não do vírus HPV na etiopatogênese do CCEO na população brasileira; - Verificar a ocorrência ou não, nos últimos anos, da transição epidemiológica do CCEO no Brasil; - A partir dos dados obtidos, caso necessário, propor complementações no processo diagnóstico (HPV positivo X HPV negativo), indicar tratamentos mais específicos que possam diminuir a morbidade e melhorar a sobrevida dos pacientes diagnosticados com CCEO.

Referências bibliográficas

FAPERJ	
Processo n.º _____	
Data: ____/____/____	Fls.: ____
Rubrica: _____	

AL-SWIAHB, J. N. et al. Prognostic impact of p16, p53, epidermal growth factor receptor, and human papillomavirus in oropharyngeal cancer in a betel nut-chewing area. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 136(5): 502-508, 2010.

ANANTHARAMAN, D. et al. Human papillomavirus infections and upper aero-digestive tract cancers: the ARCADE study. *J Natl Cancer Inst*, 105(8): 536-545, 2013. BABOCI, L. et al. Evidence of the causal role of human papillomavirus type 58 in an oropharyngeal carcinoma. *Virology*, 10(1): 334, 2013. BARNES, L. et al. World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005. 168p.

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg*, 29(2): 167-178, 2005. _____; SMITH, R. V.; WANG, B. et al. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 34(5): 676-688, 2010. BRINEZ, A. M. et al. Tipificación del virus de papiloma humano. *Rev Venez Oncol*, 19(4): 321-331, 2007. CAMISASCA, D. R.; HONORATO, J.; BERNARDO, V. et al. Expression of bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 45(3): 225-233, 2009. _____; SILAMI, M. A.; HONORATO, J. et al. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathologic features in patients with and without recurrence. *ORL*, 73(3): 170-176, 2011. CHATURVEDI, A. K. et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*, 29(32): 4294-4301, 2011. _____ et al. Worldwide Trends in Incidence Rates for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *J Clin Oncol*, 18: 1-10, 2013. CHERNOK, R. D. et al. HPV-Related Nonkeratinizing Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx: Utility of Microscopic Features in Predicting Patient Outcome. *Head and Neck Pathol*, 3(3): 186-194, 2009.

D'SOUZA, G. et al. Moderate predictive value of demographic and behavioral characteristics for a diagnosis of HPV 16-positive and HPV 16-negative head and neck cancer. *Oral Oncol*, 46(2): 100-104, 2010. EVANS, M. et al. Human Papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: an observational study of diagnosis, prevalence and prognosis in a UK population. *BMC Cancer*, 13: 220-230, 2013. FAKHRY, C. et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, 100(4): 261-269, 2008.

FELLER, L. et al. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Face Med*, 15: 6-15, 2010. FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127(12): 2893-2917, 2010. FISCHER, C. A. et al. P16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann Oncol*, 21(10): 1961-1966, 2010. FRANCESCHI, S. et al. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: Etiological clues. *Oral Oncol*, 36(1): 106-115, 2000. GILLISON, M. L. et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 92(9): 709-720, 2000. _____ Human papillomavirus and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for clinical research in head and neck cancers. *J Clin Oncol*, 24(36): 5623-5625, 2006. _____ et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine*, 30(Suppl5): 34-54, 2012. GOON, P. K. C. et al. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head Neck Oncol*, 1: 36, 2009. HERRERO, R. et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst*, 95(23): 1772-1783, 2003. HERBSTER, S. et al. HPV infection in Brazilian patients with esophageal squamous cell carcinoma: Interpopulational differences, lack of correlation with surrogate markers and clinicopathological parameters. *Cancer Lett*, 326(1): 52-58, 2012. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Estimativa 2012 - Incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>. KOUKOURAKIS, M. I. et al. Endogenous markers of two separate hypoxia response pathways (hypoxia inducible factor 2 alpha and carbonic anhydrase 9) are associated with radiotherapy failure in head and neck cancer patients recruited in the CHART randomized trial. *J Clin Oncol*, 24(5): 727-735, 2006. KOWALSKI, L. P.; SANABRIA, A. Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 27(3): 113-117, 2007. KREIMER, A. R. et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14: 467-475, 2005. LAIMER, K. et al. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. *Oral Oncol*, 43(2): 193-198, 2007. LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*, 11(1): 9-22, 2011. LI, W. et al. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer*, 106(4): 553-558, 2003. LICITRA, L. et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 24(36): 5630-5636, 2006.

LINDENBLATT, R. C.; MARTINEZ, G. L.; SILVA, L. E. et al. Oral squamous cell carcinoma grading systems analysis of the best survival predictor. *J Oral Pathol Med*, 41(1): 34-39, 2012. MANNARINI, L. et al. Human papilloma virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 29(3): 119-126, 2009. MARUR, S. et al. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, 11(8): 781-789, 2010. NGUYEN, N. P. et al. Human papillomavirus associated oropharyngeal cancer: a new clinical entity. *QJM*, 103(4): 229-236, 2010.

OLIVEIRA, C.M. et al. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol*, 4(69): 553-559, 2003. PIVA, M. R. et al. Detecção de HPV em lesões orais através da técnica de hibridização in situ. *Rev Cir Traumatol Buco-maxilo-fac*, 8(4): 61-68, 2008. POTTER, C.; HARRIS, A.L. Hypoxia inducible carbonic anhydrase IX, marker of tumour hypoxia, survival pathway and therapy target. *Cell Cycle*, 3(2): 164-167, 2004. QU, W. et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5 /GP6 primer systems. *J Clin Microbiol*, 35(6): 1304-1310, 1997. RIBEIRO, K. B. et al. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol*, 40(2): 489-502, 2011. SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. *Oral*

FAPERJ	
Processo n.º	
Data: __/__/____	Fls.: __
Rubrica:	

Oncology, 38: 227-234, 2002. SILVA, P. et al. Tumor expression of major vault protein is an adverse prognostic factor for radiotherapy outcome in oropharyngeal carcinoma. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 69(1): 133-140, 2007. _____ et al. Differences in the prognostic significance of tumor HIF-1 expression for outcome following radiotherapy in oropharyngeal cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 72(5): 1551-1559, 2008. SILVA JÚNIOR, J. de A.; CAMISASCA, D. R.; BERNARDO, V. et al. The significance of p53 immunoeexpression with different clones (DO-7 and PAb-240) in oral squamous cell carcinoma. ORL, 75(2): 82-90, 2013. SINGHI, A. D. & WESTRA, W. H. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of hum papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. Cancer, 116(9): 2166-2173, 2010. SNOW, A. N.; LAUDADIO, J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cells carcinomas. Adv Anat Pathol, 17(6): 394-403, 2010. VAN MONSJOU, H. S. et al. Oropharyngeal squamous cell carcinoma: a unique disease on the rise? Oral Oncol, 46(11): 780-785, 2010.

Especialidade 1
Odontologia
Especialidade 2
Patologia Bucal
Especialidade 3
Oncologia
Especialidade 4
Estomatologia
Palavra Chave 1
Câncer de orofaringe
Palavra Chave 2
Carcinoma de Células Escamosas
Palavra Chave 3
Proteína p16
Palavra Chave 4
HPV
Palavra Chave 5
Imuno-histoquímica
Palavra Chave 6
Câncer de Cabeça e Pescoço

Orçamento detalhado de Capital

Material Permanente e Equipamento Nacional							
Itens	Discriminação	Unidades	Quant	VI unit	VI total	Observações	Anexo
			0	R\$ 0.00	R\$ 0.00		

Material Permanente e Equipamento Importado							
Itens	Discriminação	Unidades	Quant	VI unit	VI total	Observações	Anexo
			0	R\$ 0.00	R\$ 0.00		

Obras e Instalações							
Itens	Discriminação	Unidades	Quant	VI unit	VI total	Observações	Anexo
			0	R\$ 0.00	R\$ 0.00		

Orçamento detalhado de Custeio

FAPERJ	
Processo n.º	
Data: ___/___/___	Fls.: ___
Rubrica:	

Serviços de Terceiros - PJ							
Itens	Discriminação	Unidades	Quant	VI unit	VI total	Observações	Anexo
			0	R\$ 0.00	R\$ 0.00		

Serviços de Terceiros - PF							
Itens	Discriminação	Unidades	Quant	VI unit	VI total	Observações	Anexo
			0	R\$ 0.00	R\$ 0.00		

Material de Consumo Nacional							
Itens	Discriminação	Unidades	Quant	VI unit	VI total	Observações	Anexo
7	10X EZ PREP Solution, 2L	5279771001	2	R\$ 311,00	R\$ 622,00	reagente para reação	Sim
8	BenchMark Ultra CC1	5424569001	2	R\$ 640,00	R\$ 1280,00	reagente para reação	Sim
5	BenchMark Ultra LCS	5424534001	12	R\$ 109,00	R\$ 1308,00	reagente para reação	Sim
5	Bluing Reagent	5266769001	2	R\$ 127,00	R\$ 254,00	reagente para reação	Sim
1	CINtec® p16 Histology	6695248001	10	R\$ 1453,65	R\$ 14536,50	kit para reação de imuno-histoquímica para p16	Sim
6	Hematoxylin II	5277965001	2	R\$ 115,00	R\$ 230,00		Sim
3	Label, Blank, Flap, 540 Roll	5247829001	2	R\$ 160,00	R\$ 320,00	reagente para reação	Sim
10	Microscope Slide, Superfrost Plus (FoC)	5244927001	10	R\$ 330,00	R\$ 3300,00	laminas para colocar os recortes para reação imuno-histoquímica	Sim
9	Reaction Buffer Concentrate (10X)	5353955001	2	R\$ 161,00	R\$ 322,00	reagente para reação	Sim
4	Ribbon, Ebar Printer	5250889001	3	R\$ 53,00	R\$ 159,00	reagente para reação	Sim
2	UltraView Universal DAB Detection Kit	5269806001	3	R\$ 1964,00	R\$ 5892,00	kit de detecção da reação	Sim
			50	R\$ 5423,65	R\$ 28223,50		

Material de Consumo Importado							
Itens	Discriminação	Unidades	Quant	VI unit	VI total	Observações	Anexo
			0	R\$ 0.00	R\$ 0.00		

Diárias							
Itens	Discriminação	Unidades	Quant	VI unit	VI total	Observações	Anexo
			0	R\$ 0.00	R\$ 0.00		

Passagens							
Itens	Discriminação	Unidades	Quant	VI unit	VI total	Observações	Anexo
			0	R\$ 0.00	R\$ 0.00		

Despesa de importação							
Itens	Discriminação	Unidades	Quant	VI unit	VI total	Observações	Anexo

FAPERJ	
Processo n.º _____	
Data: ____/____/____	Fls.: ____
Rubrica: _____	

		0	R\$ 0.00	R\$ 0.00		
--	--	---	----------	----------	--	--

Orçamento Resumido

ORÇAMENTO DETALHADO DE CUSTEIO				
Descrição das despesas	Solicitado à Faperj	Contra Partida	Total por rubrica	Percentual
Serviços de Terceiros - PJ	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0
Serviços de Terceiros - PF	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0
Material de Consumo Nacional	R\$ 28223,50	R\$ 0,00	R\$ 28223,50	100
Material de Consumo Importado	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0
Diárias	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0
Passagens	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0
Despesa de importação	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0
	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0
	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0
	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0
ORÇAMENTO DETALHADO DE CAPITAL				
Material Permanente e Equipamento Nacional	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0.00
Material Permanente e Equipamento Importado	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0.00
Obras e Instalações	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0.00
	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0.00
	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0.00
	R\$ 0.00	R\$ 0,00	R\$ 0.00	0.00
TOTAL ORÇAMENTO	R\$ 28223,50	R\$ 0,00	R\$ 0.00	100%

Termo de compromisso

Declaro, para fins de direito, conhecer as Normas gerais fixadas pela FAPERJ para concessão de Bolsas e Auxílios e assumo compromisso de dedicar-me às atividades de pesquisa ou ensino durante a vigência do benefício.

Local: _____ Data: ____/____/____

Assinatura do Proponente: _____

Concordância da instituição: _____



FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
Secretaria de Estado de Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro

FAPERJ
Processo n.º
Data: __/__/____ Fls.: __
Rubrica:

Nome:

Cargo:

Assinatura e carimbo: _____

Data de envio para Faperj: 28/11/2014

8.3 FICHA DE REGISTRO

CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE						FICHA DE REGISTRO	
Codificação do participante: <input type="text"/>			Responsável por preencher:		Data:		
Estado civil:				Ocupação:			
IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE							
Sexo	Masc <input type="checkbox"/>	Fem <input type="checkbox"/>	Cor:	B <input type="checkbox"/>	P <input type="checkbox"/>	N <input type="checkbox"/>	A <input type="checkbox"/>
Naturalidade:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	Residência:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Peso:	<input type="text"/>	Altura:	<input type="text"/>	Data da Biópsia:	<input type="text"/>	<input type="text"/>	<input type="text"/>
Escolaridade	Antecedentes Familiares			Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>		
Analfabeto <input type="checkbox"/>	Básico <input type="checkbox"/>	Incompleto <input type="checkbox"/>	Médio <input type="checkbox"/>	Superior <input type="checkbox"/>			
Tabagismo	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	Ex <input type="checkbox"/>	Tipo/Dose:			
Etilismo	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	Ex <input type="checkbox"/>	Tipo/Dose:			
Nome da Mãe:						ASA:	
INFORMAÇÃO SOBRE A DOENÇA, TRATAMENTO							
Outros Tumores	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	Qual:	<input type="text"/>	cTNM		
Outras Lesões Orais:						cEstádio	
Impressão Diagnóstica:						cTNM prévio tto:	
Localização	BASE DE LÍNGUA <input type="checkbox"/>	AMIGDALA <input type="checkbox"/>	LOJA AMIGDALIANA <input type="checkbox"/>	VALECULA <input type="checkbox"/>	UVULA <input type="checkbox"/>	PALATO MOLE <input type="checkbox"/>	OUTROS Qual: <input type="checkbox"/>
	PILAR: ANTERIOR <input type="checkbox"/>	POSTERIOR <input type="checkbox"/>	PAREDE: LATERAL <input type="checkbox"/>	POSTERIOR <input type="checkbox"/>			
Tratamento Inicial			Tratamento Adjuvante			Data do tratamento inicial:	
Cirurgia <input type="checkbox"/>	Quimioterapia n° de ciclos: <input type="text"/>		Radioterapia Dose e fração: <input type="text"/>		Data final do tratamento:		
Radioterapia Dose e fração: <input type="text"/>	Suporte (CSTO) <input type="checkbox"/>		Quimioterapia n° de ciclos: <input type="text"/>				
Outras informações:							
INFORMAÇÕES SOBRE A CIRURGIA							
Esvaziamento Cervical	Sim <input type="checkbox"/>	Tipo: <input type="text"/>	Não <input type="checkbox"/>	pTNM:			
Margens Livres	Sim <input type="checkbox"/>	Após ampliação <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	pEstádio:			
Tipo Cirurgia:							
ACOMPANHAMENTO							
Recidiva	Local <input type="checkbox"/>	Regional <input type="checkbox"/>	Distância <input type="checkbox"/>				
Localização:	Tipo de tratamento da recidiva:			Data recidiva:			
Deteção da Recidiva	Clínica <input type="checkbox"/>	RX <input type="checkbox"/>	Histo <input type="checkbox"/>	Cito <input type="checkbox"/>	Outra/Qual		
Data CSTO:	1º Data SED:			Data Última Consulta:			
Data Óbito:	Causa Óbito:			Última Data SED:			
STP	sim <input type="checkbox"/>	não <input type="checkbox"/>	Local STP:			Data STP:	
Espessura do tumor:							
HISTOPATOLOGIA							
Nº Biópsia:	OMS biópsia	In situ <input type="checkbox"/>	Bem <input type="checkbox"/>	Moderadamente <input type="checkbox"/>	Pouco <input type="checkbox"/>		
Nº Cirurgia:	OMS cirurgia	In situ <input type="checkbox"/>	Bem <input type="checkbox"/>	Moderadamente <input type="checkbox"/>	Pouco <input type="checkbox"/>		
Invasão Perineural: Qual:	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>	Extracapsular	Sim <input type="checkbox"/>	Não <input type="checkbox"/>		
Descrição da lesão:							

8.4 MATERIAL COMPLEMENTAR

8.4.1 PERFIL DOS PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE HPV POSITIVOS: N=21 (6,1%).

ID Caso: ORO 037	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branca	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 45 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Loja amigdaliana e palato mole		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 3	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Sim	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 11,97 meses	Sobrevida livre de doença: 11,97 meses	Sobrevida específica: 11,97 meses
ID Caso: ORO 094	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branca	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 45 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Loja amigdaliana e úvula		Tratamento inicial: RxT e QT	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 3	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Sim (regional)	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Não
Óbito por câncer: Não	Sobrevida global: 14,93 meses	Sobrevida livre de doença: 12,13 meses	Sobrevida específica: 14,93 meses
ID Caso: ORO 114	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branca	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 57 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Amígdala, pilar amigdaliano anterior e palato mole		Tratamento inicial: RxT e QT	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: III	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 2	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Sim (local)	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 21,53 meses	Sobrevida livre de doença: 9,47 meses	Sobrevida específica: 21,53 meses
ID Caso: ORO 120	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branca	Escolaridade: 1º grau completo
Idade: 77 anos	Tabagismo: Não	Etilismo: Não	Tumor de sítio único: Sim
Localização: Base de língua		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Bem diferenciado	Broders: 1	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Sim	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 5,03 meses	Sobrevida livre de doença: 5,03 meses	Sobrevida específica: 5,03 meses
ID Caso: ORO 153	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branca	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 54 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Loja amigdaliana, base de língua e valécula		Tratamento inicial: Suporte	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 3	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 0,30 meses	Sobrevida livre de doença: 0,30 meses	Sobrevida específica: 0,30 meses
ID Caso: ORO 172	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branca	Escolaridade: Analfabeto
Idade: 63 anos	Tabagismo: Ex	Etilismo: Ex	Tumor de sítio único: Sim
Localização: Palato mole		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: III	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 3	Status HPV: Positivo (p16 e E6)

Recidiva: Sim (local)	Progressão da doença: Sim	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 47,40 meses	Sobrevida livre de doença: 25,40 meses	Sobrevida específica: 47,40 meses
ID Caso: ORO 185	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branca	Escolaridade: Superior completo
Idade: 42 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Base de língua, pilar amigdaliano anterior e parede lateral		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 2	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Sim	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 11,97 meses	Sobrevida livre de doença: 11,97 meses	Sobrevida específica: 11,97 meses
ID Caso: ORO 204	Sexo: Masculino	Cor da pele: Pardo	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 71 anos	Tabagismo: Ex	Etilismo: Ex	Tumor de sítio único: Não
Localização: Palato mole e úvula		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: III	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 3	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Sim (local)	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 19,80 meses	Sobrevida livre de doença: 13,73 meses	Sobrevida específica: 19,80 meses
ID Caso: ORO 212	Sexo: Masculino	Cor da pele: Negro	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 60 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Base de língua, amígdala, úvula, pilar anterior e palato mole		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 2	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Sim	Segundo tumor primário: Sim	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 14,33 meses	Sobrevida livre de doença: 14,33 meses	Sobrevida específica: 14,33 meses
ID Caso: ORO 227	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branco	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 56 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Ex	Tumor de sítio único: Sim
Localização: Úvula		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 3	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Sim (local)	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 14,00 meses	Sobrevida livre de doença: 12,20 meses	Sobrevida específica: 14,00 meses
ID Caso: ORO 233	Sexo: Masculino	Cor da pele: Pardo	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 49 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Base de língua e pilar amigdaliano anterior		Tratamento inicial: RxT e QT	Tratamento adjuvante: Sim
cTNM: III	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 3	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Sim (regional)	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 22,03 meses	Sobrevida livre de doença: 21,07 meses	Sobrevida específica: 22,03 meses
ID Caso: ORO 234	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branco	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 55 anos	Tabagismo: Ex	Etilismo: Ex	Tumor de sítio único: Não
Localização: Palato mole e úvula		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Pouco diferenciado	Broders: 4	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Sim (local)	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 5,43 meses	Sobrevida livre de doença: 4,93 meses	Sobrevida específica: 5,43 meses
ID Caso: ORO 252	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branco	Escolaridade: Superior incompleto

Idade: 63 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Sim
Localização: Loja amigdaliana		Tratamento inicial: RxT e QT	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 3	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 21,97 meses	Sobrevida livre de doença: 21,97 meses	Sobrevida específica: 21,97 meses
ID Caso: ORO 271	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branco	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 62 anos	Tabagismo: Ex	Etilismo: Ex	Tumor de sítio único: Não
Localização: Amígdala e loja amigdaliana		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: II	OMS: Bem diferenciado	Broders: 1	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Sim (local)	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 18,30 meses	Sobrevida livre de doença: 7,40 meses	Sobrevida específica: 18,30 meses
ID Caso: ORO 274	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branco	Escolaridade: 1º grau completo
Idade: 60 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Loja amigdaliana, pilar anterior e posterior, úvula e palato mole		Tratamento inicial: RxT e QT	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: III	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 2	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Não
Óbito por câncer: Não	Sobrevida global: 9,00 meses	Sobrevida livre de doença: 9,00 meses	Sobrevida específica: 9,00 meses
ID Caso: ORO 288	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branco	Escolaridade: 2º grau completo
Idade: 59 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Pilar anterior e posterior, parede lateral e palato mole		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: III	OMS: Pouco diferenciado	Broders: 4	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 2,57 meses	Sobrevida livre de doença: 2,57 meses	Sobrevida específica: 2,57 meses
ID Caso: ORO 292	Sexo: Masculino	Cor da pele: Branco	Escolaridade: Analfabeto
Idade: 57 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Sim
Localização: Loja amigdaliana		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Pouco diferenciado	Broders: 4	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 1,03 meses	Sobrevida livre de doença: 1,03 meses	Sobrevida específica: 1,03 meses
ID Caso: ORO 296	Sexo: Feminino	Cor da pele: Negra	Escolaridade: Analfabeto
Idade: 89 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Não	Tumor de sítio único: Não
Localização: Loja amigdaliana, úvula e palato mole		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: III	OMS: Pouco diferenciado	Broders: 4	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Sim	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Sim	Sobrevida global: 12,27 meses	Sobrevida livre de doença: 12,27 meses	Sobrevida específica: 12,27 meses
ID Caso: ORO 297	Sexo: Feminino	Cor da pele: Parda	Escolaridade: Analfabeto
Idade: 56 anos	Tabagismo: Ex	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Loja amigdaliana, amígdala, úvula, palato mole e parede lateral		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: III	OMS: Pouco diferenciado	Broders: 4	Status HPV: Positivo (p16 e E6)

Recidiva: Não	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Não
Óbito por câncer: Não	Sobrevida global: 117,10 meses	Sobrevida livre de doença: 117,10 meses	Sobrevida específica: 117,10 meses
ID Caso: ORO 306	Sexo: Masculino	Cor da pele: Negro	Escolaridade: Analfabeto
Idade: 68 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Sim
Localização: Pilar amigdaliano anterior		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: I	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 2	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Sim (regional)	Progressão da doença: Não	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Sim
Óbito por câncer: Não	Sobrevida global: 28,07 meses	Sobrevida livre de doença: 25,30 meses	Sobrevida específica: 25,50 meses
ID Caso: ORO 315	Sexo: Masculino	Cor da pele: Negro	Escolaridade: 1º grau incompleto
Idade: 76 anos	Tabagismo: Sim	Etilismo: Sim	Tumor de sítio único: Não
Localização: Loja amigdaliana, palato mole e parede lateral		Tratamento inicial: Radioterapia	Tratamento adjuvante: Não
cTNM: IV	OMS: Moderadamente diferenciado	Broders: 3	Status HPV: Positivo (p16 e E6)
Recidiva: Não	Progressão da doença: Sim	Segundo tumor primário: Não	Óbito: Não
Óbito por câncer: Não	Sobrevida global: 4,20 meses	Sobrevida livre de doença: 4,20 meses	Sobrevida específica: 4,20 meses

ID Caso	p16	E6	Assinatura Padrão	Assinatura 4 CpG	Assinatura 2 CpG
7	Green				
8			Gold		
9	Green		Gold	Grey	Red
10			Gold		
11		Blue	Gold		
20			Gold	Grey	
24			Gold	Grey	Red
25			Gold	Grey	Red
26			Gold	Grey	Red
28			Gold		
31		Blue		Grey	
33		Blue			
34			Gold		
35	Green				
37	Green	Blue			
38			Gold	Grey	
41			Gold	Grey	Red
42		Blue	Gold	Grey	
44		Blue			
49		Blue	Gold	Grey	
51			Gold	Grey	Red
52		Blue	Gold		
53		Blue	Gold	Grey	
54		Blue	Gold	Grey	Red
55		Blue	Gold	Grey	Red
56		Blue			
59		Blue	Gold	Grey	Red
63			Gold	Grey	
64		Blue	Gold	Grey	Red
65		Blue	Gold		
66			Gold		
69			Gold	Grey	
76		Blue	Gold		
79			Gold	Grey	
81			Gold	Grey	Red
82					Red
83	Green				
84			Gold	Grey	
85			Gold	Grey	
86			Gold	Grey	Red
88			Gold	Grey	Red
90			Gold	Grey	
94	Green	Blue	Gold	Grey	Red
97			Gold		
98			Gold	Grey	
108			Gold		
109			Gold	Grey	
110			Gold	Grey	
111			Gold	Grey	
114	Green	Blue	Gold	Grey	Red
118			Gold	Grey	
119			Gold	Grey	
120	Green	Blue	Gold	Grey	Red
127			Gold	Grey	Red
128			Gold		
129	Green		Gold	Grey	Red
139			Gold	Grey	
141			Gold		Red
144	Green		Gold	Grey	Red
152			Gold	Grey	
153	Green	Blue	Gold	Grey	Red

Continuação...

Continuação...

ID Caso	p16	E6	Assinatura Padrão	Assinatura 4 CpG	Assinatura 2 CpG
163			Gold	Grey	
165			Gold	Grey	
166			Gold	Grey	
167			Gold	Grey	Red
169			Gold	Grey	Red
170	Green		Gold	Grey	Red
171			Gold	Grey	
172	Green	Blue	Gold	Grey	Red
173					
174					
176	Green				
182			Gold	Grey	Red
183					
184					
185	Green	Blue	Gold	Grey	Red
187		Blue	Gold	Grey	Red
188				Grey	
191			Gold	Grey	
195			Gold	Grey	
196			Gold	Grey	Red
198			Gold	Grey	
200			Gold	Grey	
204	Green	Blue	Gold	Grey	
211		Blue			
212	Green	Blue			
218			Gold	Grey	
219		Blue	Gold	Grey	Red
227	Green	Blue			Red
233	Green	Blue	Gold	Grey	Red
234	Green	Blue	Gold	Grey	Red
238	Green				
242	Green		Gold	Grey	Red
252	Green	Blue	Gold	Grey	Red
264	Green				Red
265			Gold	Grey	Red
269			Gold	Grey	
271	Green	Blue	Gold	Grey	Red
274	Green	Blue	Gold	Grey	Red
276			Gold	Grey	Red
277			Gold	Grey	
282			Gold	Grey	
284			Gold	Grey	
285			Gold	Grey	
288	Green	Blue	Gold	Grey	
292		Blue			
296	Green	Blue	Gold	Grey	Red
297	Green	Blue	Gold	Grey	Red
300					
306	Green	Blue	Gold	Grey	Red
315	Green	Blue	Gold	Grey	Red
338		Blue			Red

Legenda: p16 positivo E6 positivo Assinatura padrão positiva Assinatura 4 CpG positiva Assinatura 2 CpG positiva

ANEXO 8.5 DETALHAMENTO DOS CASOS HPV+

8.5.1 ESQUEMA DEMONSTRANDO OS CASOS HPV POSITIVOS FRENTE AS DIFERENTES TÉCNICAS UTILIZADAS.