

**,UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE GRADUAÇÃO CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BACHARELADO**

JULIA OLIVEIRA SOARES

**PRESENÇA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM ESFOLIADO DAS
LESÕES ORAIS LEUCOPLÁSICAS E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
BOCA**

CAMPO GRANDE

2022

JULIA OLIVEIRA SOARES

**PRESENÇA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM ESFOLIADO DAS
LESÕES ORAIS LEUCOPLÁSICAS E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA**

Trabalho de Conclusão de Curso como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob orientação da Prof^a Dr^a Inês Aparecida Tozetti.

CAMPO GRANDE

2022

Aos meus pais, irmãos, às minhas avós Delfina e
Maria Catarina, e ao meu falecido avô Evandro.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha vida, saúde e pela oportunidade de entrar numa universidade.

À minha família pelo amor, suporte, por terem sido minha maior força e incentivo durante esses quatro anos e durante a elaboração desse trabalho.

Aos meus professores, em especial à Prof^a Dr^a Inês Aparecida Tozetti, por tudo que fez por mim como orientadora. Sempre me orientou com dedicação, paciência e que me inspira muito como profissional.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia, em especial à colega Jennifer Naed, pela ajuda durante toda a elaboração deste trabalho e principalmente pela amizade.

Aos meus melhores amigos Luiza Sotto e Rodrigo Santos, pela amizade desde o nosso primeiro dia na UFMS. Vocês com certeza tornaram a caminhada mais leve e se chegamos juntos até aqui, é porque aprendemos muito uns com os outros.

Aos meus calouros/afilhados que mesmo sem saber, me ajudaram a perceber meu propósito dentro do curso. Me entregaram a melhor das amizades e nunca negaram ajuda, seja ela no momento que fosse.

À Faculdade de Odontologia (FAODO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande-MS e Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) da Secretaria Municipal de Saúde (SESAU) de Campo Grande-MS.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, CHAMADA FUNDECT Nº 08/2020 – PPSUS processo 71/000.503/2021

E a todos que fazem parte direta ou indiretamente da minha formação, meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

ARTIGO “PRESENÇA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM ESFOLIADO DAS LESÕES ORAIS LEUCOPLÁSICAS E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA”.

RESUMO	11
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3. RESULTADOS	17
4. DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÃO	27
6. AGRADECIMENTOS	27
7. REFERÊNCIAS	27
 ANEXOS	
Capa da revista Vittalle	33
Regras de publicação: Revista Vittalle	34

**PRESENÇA DE PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV) EM ESFOLIADO DAS
LESÕES ORAIS LEUCOPLÁSICAS E CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE
BOCA**

**Presence of human papillomavirus (HPV) in exfoliation from oral leukoplakic and
oral squamous carcinoma lesions**

Julia Oliveira Soares^{1,2} *; Jennifer Naed Martins De Freitas³; Simone B.S.
Vasconcelos⁴; Inês Aparecida Tozetti^{1,3}

¹Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios, Instituto de Biociências (INBIO), Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

²Graduação em Ciências Biológicas Bacharelado, Inbio, UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

³Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina (FAMED), UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

⁴Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste, FAMED, UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

¹*Autora correspondente: julia.soares@ufms.br (Soares, J.O)

RESUMO

As Leucoplasias são as lesões cancerizáveis mais comuns da boca e o Carcinoma Epidermóide de Boca (CEB) representa 95% das neoplasias orais malignas. Estudos correlacionando o Papilomavírus humano (HPV) com o câncer de boca têm crescido, embora sejam controversos. Por isso, este trabalho teve o objetivo de detectar a presença do DNA de HPV em esfoliado das lesões orais Leucoplásicas e CEB. Os dados socioeconômicos e clínicos dos pacientes foram obtidos por consulta ao prontuário, questionário misto e anamnese de exame clínico intrabucal. Para a detecção do HPV por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizadas, células esfoliadas obtidas da superfície das lesões observadas e de demais regiões da cavidade oral. Para a análise histopatológica as amostras das lesões foram coletadas por biópsia incisional. Os resultados apontaram uma frequência de 25,64% para DNA-HPV na cavidade oral, sendo a maioria das amostras positivas para carcinoma ou displasia moderada (7,69%). A maioria dos pacientes positivos para DNA-HPV pertenciam ao sexo masculino, com idade média de 54,6 anos, com os principais comportamentos de risco sendo a não utilização de preservativos (80%), o uso do tabaco (70%), o uso de próteses dentárias (50%) e a ingestão de álcool (40%). Este estudo demonstrou uma alta frequência do DNA de HPV em pacientes com lesões orais e CEB, bem como um perfil de hábitos de risco predisponentes à infecção.

Palavras-chave: Displasia, orofaringe, cavidade oral, carcinogênese

ABSTRACT

Leukoplakia are the most common cancerous lesions of the mouth and Squamous Cell of Oral Carcinoma, representing 95% of malignant oral neoplasms. Studies correlating human papilloma (HPV) with mouth cancer has grown, although they're controversial. Therefore, this work aimed to detect the presence of HPV-DNA in exfoliated oral Leukoplasic and Oral Carcinoma. The socioeconomic and clinical data of the patients were obtained by consulting the medical records, mixed questionnaire and anamnesis of intraoral clinical examination. For the detection of HPV by Polymerase Chain Reaction (PCR), exfoliated cells obtained from the surface of the observed lesions and from other regions of the oral cavity were used. For histopathological analysis, samples of lesions were collected by incisional biopsy. The results showed a frequency of 25.64% for DNA-HPV in the oral cavity, with most samples being positive for carcinoma or moderate dysplasia (7.69%). Most patients positive for DNA-HPV were male, with a mean age of 54.6 years, with the main risk behaviors being non-use of condoms (80%), tobacco use (70%), use of dental prostheses (50%) and alcohol consumption (40%). This study demonstrated a high frequency of HPV-DNA in patients with oral lesions and oral squamous cell carcinoma, as well as a profile of risk habits predisposing to infection.

Key Words: Dysplasia, oropharynx, oral cavity, carcinogenesis

1. INTRODUÇÃO

Em 2020, aproximadamente 3,5 bilhões de pessoas estavam com alguma doença oral, e dessas estima-se que o Carcinoma Epidermóide de Boca (CEB) estava entre as três doenças mais comuns (1). O CEB engloba toda a mucosa oral e a orofaringe, sendo mais comum com o avançar da idade e variando com a condição socioeconômica. O Papilomavírus Humano (HPV) é atualmente o principal responsável pelos casos de câncer de colo de útero e está sendo relacionado com os crescentes casos de câncer de orofaringe no Brasil e no mundo (2). Sabe-se que é um vírus que possui em torno de 200 variantes, sendo que 20 estão classificadas como de alto risco oncogênico (3).

Na literatura, a carcinogênese pelo HPV pode ser explicada pela expressão de dois genes que interferem na função de duas proteínas da célula hospedeira, esses genes são conhecidos como E6 e E7, que afetam no ciclo celular pelo bloqueio da apoptose e indução da malignização das células (4, 5). Essa interação com a célula hospedeira, é um dos fatores que permitem classificar o HPV como de alto e baixo risco oncogênico (6).

Estudos apontam que no norte da Europa os crescentes casos de câncer de orofaringe se deram através do aumento de infecção por HPV (1). Na Itália, a presença do HPV na cavidade oral utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), encontrou-se uma prevalência do vírus na população variando de 1,2% (7) à 3,3% (8), número baixo se comparado com os estudos realizados na China, de 55% (9) e 56% na Noruega (10), também utilizando a PCR.

No Brasil o câncer oral é um crescente problema de saúde pública. Na década de 90, por exemplo, já era responsável por 4% de todos os tipos de câncer, ocupando a oitava e décima primeira posição de cânceres mais frequentes entre homens e mulheres, respectivamente (11). Em 2014 foram mais de 15 mil casos de câncer de cabeça e pescoço, incluindo nesta classificação os carcinomas orais e orofaríngeos, entre esses 11.280 em homens e 4.010 em mulheres (12).

Estudo realizado na cidade de Belém, no estado do Pará, utilizando a técnica de PCR, apontou que entre 166 voluntários, 24,1% apresentavam o HPV na cavidade oral, sendo um dos critérios de inclusão dos pacientes no estudo, apresentarem lesões clinicamente diagnosticados na boca (13). Sabe-se que tais carcinomas orais são as

leucoplasias (14) e estudos que correlacionam lesões na cavidade oral e infecção por HPV no mesmo ambiente, têm sido cada vez mais necessários.

As Leucoplasias são em sua maioria lesões benignas, de cor branca, não removível à raspagem, mas com um potencial cancerígeno e que podem ser encontradas em toda a mucosa oral (15). Sua causa é variada, mas é regularmente associada ao tabagismo e ao etilismo, praticados com mais frequência por homens com mais de 50 anos, sendo este grupo o mais afetado (16).

Além das Leucoplasias, temos o CEB, um tipo de câncer que representa 95% das neoplasias orais malignas. Possui um aspecto de úlcera com endurecimento e infiltração periférica, podendo ter manchas vermelhas ou brancas na lateral da língua ou do assoalho oral (17). Registrou-se que nos últimos 20 anos, a prevalência do CEB subiu de 20% para 70%, em alguns locais da Europa e nos Estados Unidos (18). Sabe-se que o HPV é um fator de risco para esse tipo de câncer (19).

Considerando o crescente aparecimento de câncer e lesões pré-cancerosas na mucosa oral, em jovens de 18-29 anos que tiveram contato com o HPV (20), tendo em vista os estudos controversos relacionando a infecção por HPV e as lesões orais, a baixa taxa de sobrevivência desses pacientes quando acometidos por CEB (21), e a importância deste vírus por ser responsável por uma das infecções sexualmente transmissíveis mais comuns do mundo, torna-se necessário a investigação relacionando a presença do HPV, Leucoplasia e CEB na cavidade oral.

Sendo assim, este trabalho tem como objetivo detectar a presença do DNA de Papilomavírus humano (HPV) em esfregado da cavidade oral de pacientes com lesões leucoplásicas e Carcinoma epidermóide de boca.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Caracterização do estudo

Este estudo tratou-se de uma pesquisa quantitativa descritiva observacional, de corte transversal do tipo não probabilístico por conveniência, envolvendo pacientes atendidos de julho de 2018 a dezembro de 2020, nas Clínicas da Faculdade de Odontologia (FAODO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande-MS e no Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) da Secretaria Municipal de Saúde (SESAU) de Campo Grande-MS.

Participantes da pesquisa

Participaram do estudo 41 pacientes selecionados de acordo com os seguintes critérios de inclusão: pacientes de ambos os sexos, acima de 18 anos de idade e que apresentaram lesões em mucosa oral, classificadas clinicamente como Leucoplasia e/ou Carcinoma Epidermóide de Boca (CEB) e que estavam de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram considerados critérios de exclusão: Gestantes e pacientes com alterações cognitivas.

Instrumento para coleta de dados secundários

Os dados secundários dos participantes da pesquisa foram obtidos na ocasião do recrutamento, pela aplicação de questionário adaptado, com um conjunto de perguntas fechadas e mistas, relacionadas a fatores sócio-comportamentais aplicados durante a consulta. Os dados clínicos do paciente foram obtidos por consulta ao prontuário e à anamnese de exame clínico intrabucal executado de forma abrangente e sistêmica.

Procedimentos e técnicas

Coleta das amostras

Para a detecção do HPV por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foram utilizadas, células esfoliadas obtidas da superfície das lesões observadas na mucosa oral, e das demais regiões da cavidade oral, coletadas segundo Machado *et al.* (22) por meio de 5-10 gentis escovações, utilizando escova cervical com ponta protegida, por procedimento não invasivo sem riscos de traumas ou lacerações ao paciente. Após a esfoliação celular as escovas foram acondicionadas em tubos cônicos do tipo Falcon com capacidade de 15ml e armazenadas sob refrigeração a -20 °C até o momento da realização dos testes moleculares.

Para a análise histopatológica, as amostras das lesões foram coletadas por biópsia incisional, utilizando anestesia infiltrativa com octopressina 3%, material cirúrgico como cabo de bisturi tipo Baden-Parker e lâmina de bisturi 15c, curetas de periodontia, tesouras de ponta romba e fina, porta agulha, agulha e fio de sutura de seda, gerando o mínimo de desconforto possível ao paciente. Após o procedimento o paciente foi medicado com analgésico e orientado a reportar qualquer reação adversa aos responsáveis pela pesquisa, para o devido encaminhamento às clínicas da FAODO.

Os fragmentos obtidos por biópsia incisional foram fixados em formol a 10%, emblocados em parafina. Os cortes de 5µm de espessura foram corados com a técnica clássica de Hematoxilina e Eosina, sendo então encaminhados para análise histopatológica quanto ao padrão morfológico das lesões. As lâminas foram observadas em microscópio de luz nos aumentos de 40, 100 e 400 vezes por um patologista bucal.

As amostras analisadas foram divididas em quatro grupos de acordo com o grau de displasia: (1) Epitélio sem displasia, (2) Displasia epitelial discreta, (3) Displasia epitelial moderada, (4) Carcinoma Epidermóide.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Extração das amostras

As amostras obtidas por esfoliação da cavidade oral, acondicionadas em tubos do tipo Falcon e armazenadas sob refrigeração a -20°C, foram submetidas à extração pela técnica de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (v/v/v), devido ao seu alto rendimento e baixo custo. Após a extração, as amostras foram novamente armazenadas a -20°C até o momento do processamento.

As amostras foram analisadas quanto a sua pureza e a concentração de material genético com a dosagem deste conteúdo, pelo equipamento de espectrofotometria da marca *Biodrop*, com o comprimento de onda de 260 e 280 nm. As amostras já extraídas e com o conteúdo de DNA dosado foram submetidas a Reação de *Nested* -PCR PGMY/GP+.

***Nested*-PCR PGMY/GP+**

A *Nested*-PCR é uma reação que amplifica regiões menores dentro de regiões já amplificadas por uma PCR já feita anteriormente. Para essa reação, também são selecionados *primers* que atuam tanto na primeira etapa de amplificação, quanto na segunda etapa, tornando a reação muito mais específica e sensível.

Para um controle endógeno da reação de PCR, foram utilizados os *primers* direcionados à parte da região gênica que codifica para cadeia de β-globina Humana, PC04 e GH20, amplificando um fragmento de 286pb, presentes no DNA humano (23) e para detectar a presença do DNA do HPV nas amostras, utilizou-se um *pool* de *primers* PGMY 09/11 (24) que amplifica um fragmento de 450pb que é comum à todos os tipos virais e

os *primers* GP5+ e GP6+ (25) que amplificam um fragmento de 150pb, ambos direcionados à região L1 (*Late 1*) do genoma viral.

Em capela de fluxo laminar, foi preparada uma solução contendo: Tampão para PCR Tris-EDTA pH 8,4 [10X]; dNTPs 2,5mM; MgCl₂ 3,5 mM; enzima Taq DNA polimerase; *primer* para HPV PGMY09/11, *primer* para β-globina PCO4/GH20 e água ultrapura estéril.

A um volume final de 45μl de solução foi adicionado 5μl do DNA 50ng/μl, recuperado de cada amostra, sendo essa mistura processada em termociclador, sob as seguintes condições: 95 °C, por cinco minutos, para desnaturação e, em seguida, por 40 ciclos de três passos (etapas) de 94 °C por um minuto, 55 °C por um minuto e 72 °C por um minuto. Após esses 40 ciclos, realizou-se uma extensão final a 72 °C, durante cinco minutos. Os produtos permaneceram congelados a -20 °C até que fossem submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Foi separada uma alíquota de 2μl dos produtos da amplificação (amplicon) β-globina/positivos e então adicionada ao volume final de 23μl da seguinte solução preparada em capela de fluxo laminar: tampão para PCR Tris-EDTA pH 8,3 [10X]; MgCl₂ 50mM; dNTPs 2,5mM; enzima Taq polimerase; *primer* para HPV GP5+ 10mM; *primer* para HPV GP6+ 10mM; água ultrapura.

Esta solução foi processada em termociclador, sob as seguintes condições: 95 °C, por cinco minutos, para desnaturação; em seguida, por 40 ciclos de 94 °C, por um minuto, 40 °C por dois minutos e 72 °C, por 1,5 minutos. Após esses 40 ciclos, seguiu-se a uma extensão final a 72 °C, durante cinco minutos. Os produtos permaneceram congelados a -20 °C, até que fossem submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%.

Detecção dos produtos da PCR

Foram pipetados 8μl do produto da PCR e adicionados a 3μl da solução tampão [2X] de corrida de azul de bromofenol. A mistura obtida foi aplicada no gel de agarose 1,5%. Foram aplicados no mesmo gel 5μl do marcador de massa molecular (100bp). A fonte foi ajustada para 100V, por uma hora. Após a corrida, o gel foi corado em banho com solução de brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta (UV), em um transiluminador e fotodocumentado no equipamento DigiDoc-It UVP, sendo os resultados visualizados através do *Software* Doc. It-LS.

Análise estatística

A análise estatística foi desenvolvida usando o programa estatístico SPSS 10.0. As tabelas de frequência foram analisadas utilizando o teste X^2 Qui-quadrado de Pearson, com 95% de intervalo de confiança. A correlação entre os resultados do histopatológico foi calculada pelo teste de Kruskal Wallis.

Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMS (CEP/UFMS) sob parecer nº 2.621.049 de 25 de abril de 2018, CAAE 87378918.7.0000.0021

3. RESULTADOS

População de estudo

Participaram do estudo 41 pacientes sendo 32 do sexo masculino e nove do sexo feminino. A faixa etária dos participantes variou entre 35 e 84 anos, com uma média de idade de 54,6 anos. Tanto a escolaridade quanto o estado civil podem ser observados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1 - Perfil sociodemográfico dos participantes do estudo, Campo Grande –MS 2018-2020

Variáveis	N	%
Estado Civil		
Solteiro	10	24,39
Casado	24	58,54
Viúvo	3	7,32
Divorciado	4	9,76
Escolaridade		
Analfabeto	4	9,76
Fundamental Incompleto	2	4,88
Fundamental Completo	20	48,78
Ensino Médio	11	26,83
Ensino Superior	2	4,88
Pós - Graduação	2	4,88

N: número de indivíduos; %: percentual de indivíduos

A idade da primeira relação sexual foi respondida por 31 dos 41 participantes, com respostas variando entre 10 e 27 anos, sendo que 63,41% relataram ser antes dos 20 anos (Tabela 2). Quanto ao número de parceiros sexuais nos últimos dois anos, houve uma variação entre um a 20 parceiros, sendo que 56,10% relataram que se relacionaram com apenas um parceiro. Quanto à quantidade de parceiros desde o início da vida sexual, houve uma variação entre um a 600 (média três parceiros), porém 48,78% não sabiam ou não quiseram responder (Tabela 2).

Com relação aos relatos dos pacientes sobre já terem tido Infecções Sexualmente Transmissíveis (ISTs), dois não quiseram responder. Aos que relataram alguma IST foi-se questionado sobre quais seriam as infecções e três pacientes relataram Gonorreia, dois relataram Sífilis e um relatou ser portador do vírus HIV.

Quanto ao uso de preservativos apenas três participantes não quiseram responder, 68,29% não utilizam preservativos (Tabela 2).

Tabela 2 –Distribuição dos participantes do estudo quanto às variáveis de risco de infecção, Campo Grande –MS 2018-2020.

Variáveis	N	Média	%
Idade da primeira relação sexual			
Antes dos 20	25		63,41
Depois dos 20	5	17	12,2
Não respondeu	10		24,39
Nº de parceiros nos últimos 2 anos			
Menor ou igual a 1	23		56,1
Mais que 1	8	1	19,51
Não sabe ou não respondeu	10		24,39
Nº de parceiros desde a primeira relação			
Até 10	16		39,03
De 10 à 20	4	3	8,76
Mais que 20	1		1,44
Não sabe ou não respondeu	20		48,78
Relato de IST			
Sim	5		12,2
Não	34	*	82,93
Não respondeu	2		4,88
Uso de preservativo			
Sim	10		24,39
Não	20	*	68,29
Não respondeu	3		7,32

N: número de indivíduos; %: percentual de indivíduos; * Não se aplica;

Quanto ao uso do tabaco, observou-se 20 pacientes não fumantes e 21 que fumaram por três anos ou mais (Tabela 3).

Dos participantes que confirmaram o consumo de bebidas alcoólicas, 31,71% afirmaram o uso de duas vezes ou menos na semana, outros 12,20% afirmaram a ingestão pelo menos três vezes, enquanto 7,32% usam diariamente. Sobre esta variável apenas um participante não quis responder (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes quanto a comportamentos de risco e presença de lesões, Campo Grande –MS 2018-2020.

Variáveis	N	%
Tabagismo		
Sim	23	56,1
Não	18	43,98
Etilismo		
Sim	21	51,23
Não	19	46,39
Não respondeu	1	2,44
Prática de sexo oral		
Sim	11	26,83
Não	25	60,98
Não respondeu	3	12,2
Uso de prótese dentária		
Sim	20	48,78
Não	21	51,22
Já apresentou lesões orais		
Sim	11	26,83
Não	29	70,73
Não respondeu	1	2,44

N: número de indivíduos; %: percentual de indivíduos;

Sobre a presença de lesões orais prévias, 26,23% responderam que sim, sendo que seis realizaram algum tratamento. Entre estes que realizaram tratamento, dois apresentaram Displasia Moderada e Leucoplasia, um relatou câncer de pele na face. Outro paciente apresentou um íngua no palato, porém não buscou tratamento.

Detecção do HPV-DNA

Ao todo foram coletadas 41 amostras, porém duas foram excluídas do estudo pois não amplificaram para o gene β -globina humano. Na figura 1 observamos a positividade para DNA de HPV pela técnica de *Nested* PCR.

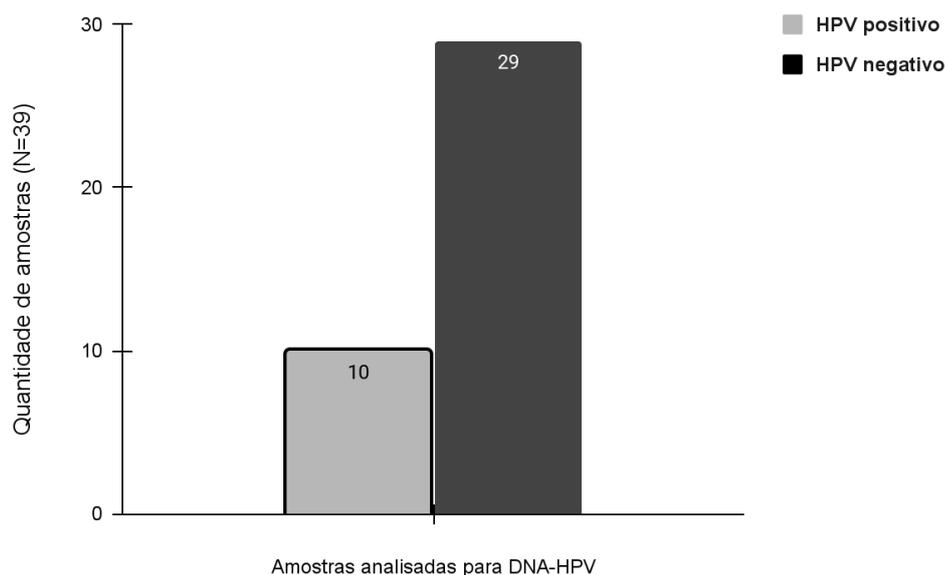


Figura 1 - Amostras analisadas para a pesquisa de DNA de HPV pela técnica de *Nested* PCR com os *primers* PGMY 09/11 e GP5+/6+ (N=39).

Os achados histopatológicos das amostras positivas para DNA de HPV podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4 - Resultados da *Nested* PCR para DNA de HPV de acordo com os achados histopatológicos, Campo Grande –MS 2018-2020 (n=39).

	<i>Nested-PCR</i>			
	POSITIVO		NEGATIVO	
	N	%	N	%
Epitélio sem displasia	2	5,12	5	12,82
Displasia epitelial discreta	2	5,12	5	12,82
Displasia epitelial moderada	3	7,69	5	12,82
Carcinoma	3	7,69	14	35,89
Total	10	25,64	29	74,35

($p > 0,05$)

Com relação ao total de amostras viáveis (n=39), de acordo com a classificação histopatológica, CEB foi a maioria com 43,58% (17/39), seguido de displasia moderada com 20,51% (8/39) e a mesma frequência foi vista para displasia discreta e epitélio sem displasia de 17,94% (7/39).

Dos 10 (10/39; 25,64%) pacientes que apresentaram positividade para DNA-HPV, 20% (2/10) pertencem ao sexo feminino, ambas casadas e que iniciaram as atividades sexuais na faixa dos 18-19 anos. Dos 80% (8/10) restantes, 50% são pacientes casados e 50% solteiros ou divorciados. Em relação às idades, para o sexo masculino a média foi de 54,2 anos para o sexo feminino de 56 anos e a idade média total 54,6 anos (Tabela 5; $p>0,05$).

Quanto à idade de primeira relação entre os pacientes positivos para DNA de HPV, as respostas variaram de 12 a 23 anos e apenas um não respondeu. O número de parceiros nos últimos dois anos foi respondido por seis participantes e nas respostas relataram de um a dois parceiros. Já em relação ao número de parceiros durante toda a vida sexual, as respostas variaram de um a 20 ($p>0,05$).

Com relação ao relato de IST, um paciente relatou a infecção Gonorreia e o número de parceiros relatados foram três ao longo da vida, porém ele informou que não faz uso de preservativos. Outros dois pacientes relataram de oito a 20 parceiros, respectivamente, desde a primeira relação e ambos não relataram ISTs, porém o uso de preservativos foi apontado por apenas um.

Quanto aos hábitos de risco para a infecção, 80% dos pacientes (8/10) não utilizam preservativos, 70% deles (7/10) faz uso do tabaco, 40% (4/10) de álcool regularmente e 30% (3/10) faz uso de ambos ($p>0,05$).

Quanto à prática de sexo oral, 20% (2/10) relataram realizar. Quanto à utilização de prótese dentária e relato de lesões, 50% (5/10) e 30% (3/10) dos pacientes, respectivamente, responderam que sim. Todos esses três hábitos foram observados ao mesmo tempo por um único participante.

Entre os pacientes positivos para DNA de HPV foram encontrados os quatro graus de displasias nos resultados histopatológicos, sendo que foi encontrada a mesma frequência tanto para Displasia Moderada quanto para CEB (30%). Também foram encontradas frequências iguais para Displasia Discreta e para Epitélio sem Displasia (20%). Não houve correlação entre o grau de lesão histopatológica e a presença do DNA de HPV.

Do total de participantes do estudo, quatro se declararam analfabetos e três deles apresentaram positividade para DNA-HPV. Em contrapartida, nenhum participante que

possuía ensino superior apresentou resultado positivo. Outras informações estão demonstradas na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados socioepidemiológicos dos pacientes positivos para DNA-HPV.

Pacientes positivos para DNA-HPV										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Dados										
Socioepidemiológicos*										
Idade	65	49	72	45	62	50	64	57	37	45
Sexo	M	M	M	M	F	F	M	M	M	M
Estado Civil	So	D	C	So	C	C	C	So	C	C
Escolaridade	Fund	Analf	Fund	EM	Fund	Fund. Inc	Analf	EM	ES	Analf
Idade da primeira relação	15	23	12	*	18	19	16	16	16	12
Parceiros nos últimos 2 anos	1	1	1	-	*	1	1	2	*	*
Parceiros desde a primeira relação	1	1	3	*	*	1	8	20	*	*
Relato de IST	N	N	S	N	N	N	N	N	N	N
Uso de preservativo	N	S	N	N	N	N	N	S	N	N
Tabagismo	N	S	S	S	N	N	S	S	S	S
Etilismo	S	S	N	N	N	N	N	S	N	S
Prática de sexo oral	N	N	N	N	N	N	S	N	S	N
Uso de prótese dentária	N	S	N	S	S	S	S	N	N	N
Relato de lesões orais	D.M	N	N	N	N	N	S	N	S	N
Histopatologia**										
	Carc	D.D	D.M	D.M	D.M	S/D	Carc	S/D	D.D	Carc

F: Feminino; M: Masculino; So: Solteiro; C: Casado; D: Divorciado; Fund: Fundamental; Inc: Incompleto; Analf: Analfabeto; E.M: Ensino Médio; E.S: Ensino Superior. D.M: Displasia Moderada; Ep. S/D: Sem displasia; Carc: Carcinoma; D.D: Displasia Discreta; N: Não; S: Sim; - *Não se aplica ou não respondeu.

Para as amostras HPV positivas de CEB e Displasia moderada em relação ao número total de amostras viáveis, obteve-se uma frequência de 7,69% (3/39) para a presença de DNA de HPV em ambas as classificações e para Epitélio sem displasia e Displasia discreta, a frequência de DNA de HPV foi de 5,12% (2/39) em ambas as classificações também. A correlação entre a presença de lesões e a positividade para DNA de HPV não foi significativa estatisticamente ($p > 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Destaca-se que o HPV esteve presente em 25,64% dos pacientes, que em sua maioria apresentaram CEB e Displasia epitelial moderada como alteração histopatológica, eram do sexo masculino e com idade média de 54,2 anos. Os fatores de risco mais frequentes, observados nos pacientes positivos para o HPV foram o uso do tabaco (80%), a não utilização de preservativos (80%) e uso de próteses dentárias (50%).

A frequência do HPV na cavidade oral ainda é discutida e observada de inúmeras maneiras. Uma variação muito grande foi relatada por Zeuss, Miller e White (26), em Gallo *et al.* (27) e Bosetti *et al.* (28), que obtiveram frequências dentro do intervalo de 0% a 93% das amostras positivas para o HPV.

Ao redor do mundo os resultados foram variados, de 2% no Reino Unido (31) a 46% na Índia (32%). No Brasil trabalhos com frequências relativamente próximas ao do presente estudo foram encontrados, como por exemplo de 19,2% para DNA-HPV 16 em pacientes jovens (33).

Quanto às localizações das lesões mais frequentemente associadas ao vírus, na literatura têm sido relatados o assoalho da boca e da língua (34). Para St Guily *et al.* (35) a mais encontrada foi especificamente a tonsila (58,9%), seguido da base da língua para a região orofaríngea e o assoalho da boca (41,1%). Em nosso estudo, ainda que não tenha sido o foco, as lesões encontradas em sua maioria foram no rebordo alveolar e lábios.

Na Índia, estudo que investigou Leucoplasias e transformações malignas em trabalhadores de uma fábrica local, verificou-se que menos de 1% das Leucoplasias clínicas representavam displasias e carcinomas e que a prevalência das Leucoplasias aumentava conforme o avanço da idade (16). Em nosso estudo, as displasias moderada e discreta juntas somam 38,45% dos casos e CEB 43,58%

O aparecimento das lesões por HPV ocorrem a partir do início da infecção, que ao atingir os genes responsáveis pelo controle de replicação, transcrição e apoptose das células infectadas, faz com que as células percam a capacidade de dar continuidade ao ciclo de vida do vírus, dando origem aos graus das lesões de acordo com a quantidade de camadas epiteliais infectadas (36).

Sobral *et al.* (37) concluíram então que o HPV estaria servindo como “porta de entrada” para uma transformação carcinogênica nas células orais, pois, pacientes com lesões, que não fazem parte da população de risco, estariam testando positivo para o vírus.

Guo, Sneige e Silva (38) observaram que a presença do HPV nas lesões aumentou com o aumento do grau do carcinoma para 8 tipos de HPV oncogênicos, deixando cada vez mais evidente que o HPV pode ser um fator tumorigênico sendo uma causa para CEB (39). No colo uterino essa relação é ainda mais estreita, para Karlsen *et al.* (40), 98% dos carcinomas apresentaram DNA-HPV positivo.

Quanto à relação entre fatores epidemiológicos e a presença e tipo do HPV, é quase um consenso que o tipo mais frequente do vírus é o HPV 16 (5; 35; 37; 41) seguido dos tipos 6 e 54 (41; 42) e 18 (21; 29; 38). Em nosso estudo, devido a qualidade do DNA obtido não foi possível realizar o sequenciamento e com isso a genotipagem viral.

A lesão mais frequente relatada foi o carcinoma, com variações de localização e idade dos pacientes, que em sua maioria pertencem ao sexo masculino (5; 41; 42). Constatou-se, porém, que menos de 6% dos casos de carcinoma ocorrem em pacientes com menos de 40 anos de idade (17).

Simonato (5) relatou que a maioria das amostras de carcinoma pertenciam a pacientes com idade abaixo dos 60 anos, porém 17% das amostras eram positivas para HPV, sendo que 100% delas pertenciam a homens com idade superior a 60 anos e não tabagistas. Também foram relatados pacientes positivos para HPV com idade superior a 60 anos por Demathé *et al.* (42). Um número próximo foi relatado neste estudo, 80% dos pacientes positivos eram homens e a idade média foi de 54,2 anos para população de estudo e no grupo HPV positivo.

Sabe-se que nos EUA o tabaco e o álcool são responsáveis por 3/4 dos cânceres de boca e faringe (43) e que o desenvolvimento de leucoplasia em fumantes é 9,7 vezes maior que em não fumantes (16). Nesta pesquisa, dos oito pacientes do sexo masculino positivos para DNA-HPV sete eram tabagistas, cinco etilistas e seis não utilizam de preservativos, e os três carcinomas positivos para HPV foram encontrados entre estes pacientes.

Petito *et al.* (21) notaram que o tabaco e o álcool tornavam o carcinoma mais agressivo e que em casos de carcinomas com DNA-HPV positivo os pacientes apresentaram uma média de idade mais baixa comparados com os carcinomas negativos (53 anos). Em Sobral *et al.* (37), o tabaco estava presente em 90% dos relatos dos pacientes e em 75% dos casos de HPV positivo.

St Guily *et al.* (35) obteve um resultado diferente dos demais autores. A maioria dos carcinomas eram de pacientes do sexo masculino, porém a positividade HPV foi maior para o público feminino, sendo de 95% para HPV 16. Araújo *et al.* (13) também obteve que a maioria dos positivos eram de pacientes do sexo feminino, com uma média de idade de 35,9 e justificou que as mulheres procuram com mais frequência os serviços de saúde por serem mais preocupadas com o bem-estar do que homens.

Em D'Souza *et al.* (20) pesquisou-se também se a orientação sexual interferia nos resultados e não se obteve diferença significativa. Quanto aos comportamentos sexuais, a prática do sexo oral foi relatada como sendo mais comum em homens e estarem 6 vezes mais propensos a pegarem HPV 16 quando comparado com mulheres.

Sobral *et al.* (37) constataram que o HPV deve ter influência individual para o desenvolvimento de carcinomas, pois mais pacientes não tabagistas estão sendo diagnosticados com carcinoma. A teoria é de que o tabaco aumentaria a resistência do epitélio e formaria uma película. Porém, Petito *et al.* (21) relatam o contrário, que o tabagismo e etilismo induz a carcinogênese por agressões extensas na área. Já Abreu (29) justifica que álcool e tabaco são carcinogênicos pelas substâncias no tabaco e que o álcool facilita a entrada da substância no epitélio, como um solvente para a camada lipídica, aumentando a chance de penetração do HPV em micro lesões e podendo aumentar em até 40 vezes o risco de carcinoma de cabeça e pescoço (44).

O diagnóstico para HPV é realizado atualmente pela técnica de PCR que tem sido utilizada cada vez mais pela sua alta especificidade e sensibilidade, uma vez que amplifica apenas a região gênica do vírus a qual os *primers* são dirigidos. Porém, resultados conflitantes têm sido publicados e baixas frequências foram vistas em trabalhos em que a técnica foi empregada, como para Rivero e Nunes (45) e Lopes *et al.* (31).

Com isso foi-se questionado o emprego da PCR e qual seria o melhor método para tal amplificação quando comparado com a *Nested-PCR*. Concluiu-se que a *Nested-PCR* consegue ser seis vezes mais específica na detecção do vírus. Ainda é necessário que a escolha de *primers*, o armazenamento e a quantidade de material coletado sejam adequados, uma vez que podem interferir em qualquer método de amplificação quando mal combinados (42).

Abreu (29), que avaliou a frequência de infecção pelo HPV em amostras de carcinomas, também pela técnica da *Nested-PCR*, encontrou uma frequência de 3,7%.

Porém, a quantidade reduzida de tumores positivos das amostras impediu a correlação entre o *status* do HPV e as variáveis utilizadas para o prognóstico. A mesma frequência foi encontrada por Lajer e Buchwald (30), com predominância do sexo masculino com hábitos etilistas e tabagistas corroborando nossos resultados.

Os *primers* utilizados nesta pesquisa foram os *primers* PGMY 09/11 e GP5/6+ que são frequentemente estudados e comparados com outros *primers*, sendo estes os conjuntos mais indicados. Ambos os conjuntos possibilitam a detecção da região L1 do vírus e possuem o diferencial da amplitude de identificação dos tipos virais. O PGMY 09/11 por exemplo, consegue identificar até 30 subtipos de HPV, 25 tipos a mais quando comparado com MY09/11 (24; 29).

Evander *et al* (46) compararam as técnicas PCR e *Nested*-PCR utilizando os mesmos conjuntos de *primers* (MY09/11 e GP5/6+) em ambas e apenas com a mudança de técnica empregada, a especificidade na detecção do HPV aumentou de 26% para 84,2%.

Neste estudo, não foi possível detectar os tipos de HPV que estavam presentes nas amostras positivas. Talvez o tempo de armazenamento das amostras tenha influenciado, uma vez que são mais sensíveis à identificação quando em tecido fresco quando comparado com a parafina (37). O modo de coleta das amostras pode ser um fator importante, influenciando na quantidade de células obtidas para a extração do de DNA, uma vez que este pode ser degradado ao longo do tempo, tornando-se insuficiente para o sequenciamento (38).

5. CONCLUSÃO

A presença do DNA-HPV na cavidade oral foi vista em 25,64% dos pacientes. Destes, a relação entre a presença de HPV e a classificação histopatológica das amostras não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

Observou-se uma alta frequência do DNA de HPV em pacientes com lesões orais e CEB, bem como um perfil de hábitos de risco associado à suscetibilidade à infecção.

Para análises futuras deverá ser ampliada a população analisada e técnicas de extração e amplificação de DNA devem ser otimizadas para permitir a análise por sequenciamento.

6. AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia (FAODO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande-MS e Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) da Secretaria Municipal de Saúde (SESAU) de Campo Grande-MS.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, CHAMADA FUNDECT Nº 08/2020 – PPSUS processo 71/000.503/2021

7. REFERÊNCIAS

1. Oral Health. WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health> Acesso em 12 Mar 2022.
2. BRASIL. Ministério da saúde. Informe técnico sobre a vacina papilomavírus humano (HPV) na atenção básica. Brasília, 2014.
3. HANS-ULRICH, B. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. Journal of Clinical Virology, Volume 32, Supplement, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.021>. Acesso em 12 Mar 2022.

4. ANTONSSON, Annika et al. Status do papilomavírus humano e expressão de p16INK4A em pacientes com carcinoma de células escamosas da mucosa de cabeça e pescoço em Queensland, Austrália. *Epidemiologia do câncer* , v. 39, n. 2, pág. 174-181, 2015.
5. SIMONATO, L. E. Detecção do HPV por nPCR em carcinomas epidermóides de assoalho bucal e sua correlação com variáveis clínico-patológicas, fatores de risco e sobrevida. 2006. 70 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba, 2006. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/91421>>.
6. Martín-Hernán *et al.* Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013 May 1;18(3):e439-44. doi: 10.4317/medoral.18419. PMID: 23524417; PMCID: PMC3668870.
7. MIGALDI, M. *et al.* Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. *J Oral Pathol Med* 2012; 41:16-20.
8. AMMATUNA, P. *et al.* Presence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus and human papillomavirus in normal oral mucosa of HIV-infected and renal transplant patients. *Oral Dis* 2001; 7:34-40
9. ZHANG, Z.Y. *et al.* T. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 1:71-4. 10.
10. KRISTOFFERSEN, A.K. *et al.* Human papillomavirus subtypes in oral lesions compared to healthy oral mucosa. *J Clin Virol* 2012; 53:364-6.
11. ARAÚJO, V.J.F. *et al.* Perfil de incidência do câncer oral em um hospital geral em São Paulo [Incidence of oral cancer profile at a general hospital in São Paulo]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 1998 May-Jun;53(3):110-3. Portuguese. PMID: 10436641.

12. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2018-2020: a incidência de câncer no Brasil. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA, 2020.
13. ARAÚJO, Marizele Viana de Aragão *et al.* Prevalência do papilomavírus humano (HPV) em Belém, Pará, Brasil, na cavidade oral de indivíduos sem lesões clinicamente diagnosticáveis. *Cadernos de Saúde Pública* [online]. 2014, v. 30, n. 5 [Acessado 28 Abril 2022] , pp. 1115-1119. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/0102-311X00138513>>. ISSN 1678-4464. <https://doi.org/10.1590/0102-311X00138513>.
14. LEE, J.J. *et al.* Predicting cancer development in oral leukoplakia: Ten years of translational research. *Clinical Cancer Research*; v.6, p.1702-10, 2000.
15. RODRIGUES, T. L. C. *et al.* Leucoplasias bucais: relação clínico-histopatológica. *Pesquisa Odontológica Brasileira* [online]. 2000, v. 14, n. 4 [Acessado 28 Abril 2022] , pp. 357-361. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1517-74912000000400009>>. Epub 12 Jan 2001. ISSN 1517-7491. <https://doi.org/10.1590/S1517-74912000000400009>.
16. SILVERMAN Jr., S. *et al.* Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57,518 industrial workers in Gujurat, India. *Cancer*, v. 38, n. 4, p. 1790-1795, Oct. 1976.
17. HIROTA, S. K. ; MIGLIARI, D. A. ; SUGAYA, N. N. Carcinoma epidermóide oral em paciente jovem: relato de caso e revisão da literatura. *Anais Brasileiros de Dermatologia* [online]. 2006, v. 81, n. 3 [Acessado 29 Abril 2022] , pp. 251-254. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0365-05962006000300007>>. Epub 24 Jul 2006. ISSN 1806-4841. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962006000300007>.
18. SATHISH, N.; WANG, X.; YUAN, Y. Human Papillomavirus (HPV)-associated Oral Cancers and Treatment Strategies. *Journal of Dental Research*. 2014;93(7_suppl):29S-36S. doi:10.1177/0022034514527969

19. MILLER, C.S; JOHNSTONE, B.M. Human Papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Sug Oral Med Oral Pathol Oral radiol Endod* 2001; 91(6): 622-35.
20. D'SOUZA, G. *et al.* Differences in oral sexual behaviors by gender, age, and race explain observed differences in prevalence of oral human papillomavirus infection. *PLoS ONE*. 2014;9:e86023.
21. PETITO, G. *et al.* P. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v.83, n. 1, p. 38-44, feb. 2017.
22. MACHADO, A.P. Detecção e tipagem de Papilomavirus humano em mucosa oral de indivíduos do sexo masculino. Dissertação (Programa de PósGraduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande -MS. 2013.
23. BAUER, H. M. *et al.* Genital human Papillomavirus infection in female University Students as determined by a PCR-Based Method. *Jama*, v. 265, n. 4, p. 472-477, 1991.
24. GRAVITT, P.E. *et al.* Improved amplification of genital human papillomaviruses. *Journal Clinical Microbiology*, v. 38, n. 1, p. 357-361, Jan, 2000.
25. QU, W. *et al.* PCR detection of human Papillomavirus between MY09/11 and GP5+/GP6+ primer sistem. *Journal of clinical microbiology*. v.35, n. 6, p. 1304-1310, 1997.
26. ZEUSS, M. S; MILLER, C. S; WHITE, D. K. In situ hybridization analysis of human papillomavirus DNA in oral mucosal lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;71:714–20.
27. GALLO, A. *et al.* Detection of human papillomavirus and adenovirus in benign and malignant lesions of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009;141:276–81.

28. BOSETTI, C *et al.* Cancer mortality in the European Union, 1970–2003, with a joinpoint analysis. *Ann Oncol* 2008;19:631–40.
29. ABREU, Priscila Marinho de. HPV e expressão de p16 como biomarcadores de prognóstico em carcinoma de células escamosas da cavidade bucal. Dissertação. 54f. Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. 2015.
30. LAJER, C.B; VON BUCHWALD, C.V. The role of human papillomavirus in neck and head cancer. *APMIS* v.118 p. 509-510, 2010.
31. LOPES, V. *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral cavity rarely harbours oncogenic human papillomavirus. *Oral Oncol.* 2011 Aug;47(8):698-701. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.04.022. PMID: 21689967.
32. CHAKROBARTY, B. *et al.* Relationship among tobacco habits, human papillomavirus (HPV) infection, p53 polymorphism/mutation and the risk of oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, v. 18, n. 2, p.211-216, maio. 2014.
33. KAMINAGAKURA, E. *et al.* High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, v. 130, n. 8, p. 1726–32, 15 abr. 2012.
34. HÜBBER, Christian U; AKGÜL, Baki. HPV and cancer of the oral cavity, *Virulence*, 6:3, 244-248, 2015. DOI: 10.1080/21505594.2014.999570
35. ST GUILY, J. L. *et al.* Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France--The EDiTH VI study. *J Clin Virol.* 2011 Jun;51(2):100-4. doi: 10.1016/j.jcv.2011.03.003. Epub 2011 May 6. PMID: 21527208.
36. FERRAZ, L. D. C; SANTOS, A. B. R; DISCACCIATI, M. G; Ciclo celular , HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical : seleção de marcadores biológicos. *Journal of the Health Sciences Institute*, v. 30, n. 2, p. 107–111, 2012.

37. SOBRAL, A. P. V.; ALMEIDA, H.C.R. De E. F.; DE SÁ J. P. Correlação do Papilomavírus Humano com o Carcinoma Epidermoide Bucal: Revisão Sistemática. *Rev. cir. traumatol. buco-maxilo-fac.* [online]. 2014, vol.14, n.2, pp. 95-102. ISSN 1808-5210.
38. GUO, M.; SNEIGE, N.; SILVA, E.G; Distribution and viral load freight oncogenic types of human papillomavirus (HPV) and HPV 16 integration status in cervical intraepithelial neoplasia and carcinoma. *Modern Pathology.* v.20, p. 256–266, 2007.
39. DAYYANI, F. *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 oncology*, v. 2, p. 15, 2010.
40. KARLSEN, F. *et al.* Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 9, p. 2095-2100,1996.
41. REIS, T. A. D. Detecção de HPV (Papiloma vírus humano) em carcinoma epidermóide bucal: estudo caso-controle. 2009. 106 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009
42. DEMATHE, Adriana *et al.* Comparação entre dois métodos de detecção de DNA de papilomavírus humano em carcinoma epidermoide de lábio. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* [online]. 2010, v. 46, n. 2 [Acessado 23 Julho 2022] , pp. 85-90. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S1676-24442010000200003>>. Epub 06 Jul 2010. ISSN 1678-4774. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442010000200003>.
43. BLOT, W. J. *et al.* Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988 Jun 1;48(11):3282-7. PMID: 3365707.
44. GALBIATTI, A. L. S. *et al.* Head and neck cancer: Causes, prevention and treatment. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 79, n. 2, p. 239–247, 2013.

45. RIVERO, E. R. C.; NUNES, F. D. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population : amplification by PCR HPV em carcinoma epidermóide de boca em população brasileira : amplificação por PCR. *Brazilian Oral Research*, v. 20, n. 1, p. 21–24, 2006.
46. EVANDER, M. *et al.* Comparison of a one-step and a two-step polymerase chain reaction with degenerate general primers in a population-based study of human papillomavirus infection in young Swedish women. *J Clin Microbiol.* 1992 Apr;30(4):987-92. doi: 10.1128/jcm.30.4.987-992.1992. PMID: 1315341; PMCID: PMC265198.

Vittalle

REVISTA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

SUBMISSÕES

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

- O processo de submissão do artigo é exclusivamente online através do site <http://www.seer.furg.br/vittalle>
- Ao cadastrar-se no sistema, é preciso preencher todos os itens solicitados; bem como, ao realizar os passos de submissão do artigo científico, é imprescindível que sejam inseridos todos os autores no sistema juntamente aos seus respectivos dados solicitados, além da indicação de possíveis revisores do manuscrito.pelos participantes, de acordo com a Resolução 196/1996 do Conselho Nacional de Saúde e o número do protocolo de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética da instituição onde foi realizado.
- Os autores deverão anexar ao processo de submissão o arquivo contendo o manuscrito no formato .doc ou .docx (Word).
- Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.
- Ao submeter o artigo, o autor correspondente assume que os demais autores estão cientes da sua participação no manuscrito

DIRETRIZES PARA AUTORES

Política Editorial

A Vittalle – Revista de Ciências da Saúde/Journal of Health Sciences é uma revista multidisciplinar que possui interesse em trabalhos na área das Ciências da Saúde, Biológicas e Humanas. Publicada em meio impresso (ISSN

1413-3563) e eletrônico (ISSN 2177-7853), a revista possui periodicidade semestral e tem como propósito incentivar a discussão de temas em saúde a partir da interlocução entre diferentes instituições de cunho científico em âmbito nacional e internacional, a fim de ampliar os saberes construídos.

A submissão de um manuscrito à Vittalle requer que o mesmo não tenha sido publicado anteriormente (exceto na forma de resumo em eventos) e que não esteja sob apreciação simultânea em outro periódico.

Os manuscritos podem ser submetidos em português ou inglês e, a partir do momento que aceitos para publicação, os mesmos passam a ser propriedade da Vittalle, sendo vedada tanto a reprodução – mesmo que parcial em outros periódicos – seja no formato impresso ou eletrônico, bem como, a tradução para outro idioma sem a autorização da Editoria Científica.

Somente serão aceitas submissões eletrônicas dos artigos, no seguinte endereço: <http://www.seer.furg.br/vittalle>

Considerações éticas

Os trabalhos de pesquisa devem ter sido submetidos e aprovados pelos respectivos Comitês de Ética em Pesquisa, de acordo com a área de atuação, sendo obrigatório inserir o número do parecer favorável à realização da pesquisa, na metodologia do artigo científico. A veracidade das informações e das citações bibliográficas é de responsabilidade exclusiva dos autores.

Avaliação das submissões

Uma vez submetido à Vittalle, o artigo científico será encaminhado para avaliação por pares. Após análise crítica dos consultores ad hoc, o artigo será reencaminhado aos autores com o posicionamento do periódico perante as condições: aprovado; aprovado com considerações ou rejeitado. Se aprovado com considerações, os autores deverão realizar os devidos ajustes solicitados tendo o cuidado de manter os comentários dos revisores na coluna da direita e as devidas alterações sugeridas grifadas em vermelho no decorrer do texto; reenviando o arquivo pronto por meio do sistema online no campo específico

para tal. Em posse da última versão do artigo, os editores realizarão a análise final do manuscrito para formatação e posterior publicação.

Após formatação pelo sistema de editoração, a prova do artigo será enviada aos autores, que terão 48 horas para revisão final do manuscrito antes de sua publicação. São de inteira responsabilidade dos autores os dados pessoais e aqueles relativos ao artigo, devendo, portanto, serem conferidos minuciosamente antes de reenviar o arquivo final.

No momento da submissão o autor correspondente deverá indicar o nome, afiliação, endereço eletrônico e área de atuação de 3 potenciais revisores para o manuscrito, no campo “Comentários para o editor”. Os revisores deverão ser de Instituições diferentes do autor correspondente. Os editores reservam o direito de utilizar ou não os revisores indicados.

Tipos de contribuições

Editorial: Sob responsabilidade do corpo editorial; este texto deve conter, no máximo, 3.000 palavras.

Artigos Originais: Apresentam resultados inéditos de trabalhos completos, prospectivos, experimentais ou retrospectivos. Os artigos podem conter até 20 páginas (incluindo folha de rosto e referências) e sua estrutura deve apresentar os tópicos: Introdução; Materiais e Métodos; Resultados; Discussão e Considerações Finais ou Conclusões. Implicações clínicas e limitações do estudo devem ser apontadas; bem como os objetivos do estudo devem ser explicitados ao final do item introdução. Os artigos referentes à estudos com seres humanos ou animais devem conter o número do parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa.

Revisão Bibliográfica: Deve ter sustentação teórica significativa e atualizada, tratando-se de uma revisão crítica do conteúdo abordado. A estrutura completa deve possuir, no máximo, 20 páginas (incluindo folha de rosto e referências). A estrutura do manuscrito poderá conter as seguintes sessões: Introdução: breve explanação sobre o assunto que será desenvolvido; Materiais e Métodos: esclarecimentos metodológicos acerca da execução do estudo; Revisão

Bibliográfica: desenvolvimento da temática de escolha; Considerações Finais ou Conclusões: conclusões que podem ser depreendidas por meio do que foi abordado. A estrutura sugerida não é obrigatória para este tipo de artigo.

Estrutura do manuscrito

A Vittalé aceita artigos submetidos em português ou inglês. Manuscritos escritos por autores cuja língua materna não é o inglês devem ser verificados por serviços de correção da língua antes da submissão, sendo este de responsabilidade do autor. O manuscrito deve ser apresentado em arquivo Word (.doc ou .docx), papel A4, fonte Times New Roman, tamanho 12, espaçamento de 1,5 cm entre as linhas, texto justificado e margens de 3,0 cm.

A estrutura do manuscrito deve ser apresentada obedecendo a seguinte ordem: Folha de rosto (1ª página) - Título do artigo centralizado, em negrito e em português e inglês seguindo esta sequência. - Nomes completos dos autores e a instituição a qual estão vinculados. - Endereço completo e e-mail do autor correspondente.

Resumo (2ª página) - Devem ser em fonte Times New Roman, tamanho 12 e espaçamento simples contendo até 250 palavras. - O resumo (abstract) do trabalho deve ser em português e inglês, e acompanhado no mínimo 3 e no máximo 6 palavras-chave (*keywords*). - O resumo deve enfatizar novos e importantes aspectos do estudo, mostrando-se sucinto, claro e objetivo. Deverá ser baseado nos subitens descritos na seção “Tipos de Contribuição” de acordo com o tipo de artigo desenvolvido.

Estrutura do Texto

A estrutura do texto deverá obedecer aos seguintes subitens abaixo:

Introdução – deve ser breve, relatando o contexto e a justificativa do estudo apoiados em referências pertinentes ao objetivo do manuscrito, o qual deverá estar explícito no último parágrafo. A introdução não deve incluir quaisquer dados ou conclusões do trabalho que está sendo apresentado.

Materiais e Métodos – deve oferecer, de forma clara e detalhada, informações suficientes para permitir que o estudo seja replicado por outros pesquisadores. Técnicas padronizadas bastam ser referenciadas. Abreviaturas e símbolos devem seguir as recomendações da IUPAC-IUB Commission (Commission on Biochemical Nomenclature, Amendments and Corrections). As unidades de medida devem seguir o Sistema Internacional de Unidades. Os autores devem explicitar que a pesquisa foi conduzida dentro dos padrões éticos e aprovada pelo Comitê de Ética (especificar qual comitê e o número do protocolo de aprovação do projeto em questão).

Resultados– deve oferecer uma descrição concisa dos achados. O texto não deve repetir os dados contidos em tabelas e/ou figuras.

Discussão – deve interpretar os resultados à luz da literatura científica e das teorias existentes no campo. Alternativamente, Resultados e Discussão podem ser apresentados em uma única seção. Tabelas e figuras – caso presentes deverão ser numerados com algarismos arábicos e submetidos juntamente com o artigo, na sequência lógica conforme mencionados no decorrer do texto; em número máximo de oito (8).

Considerações Finais ou Conclusões – devem fazer um fechamento dos principais achados do estudo retomando o objetivo e, demonstrando, dessa forma, que o mesmo foi alcançado. **Agradecimentos** – devem ser concisos e incluir as fontes de financiamento, se houver.

Conflito de interesses – Se houver conflitos de interesse, os autores deverão declará-los, nesta seção.

Referências – Devem ser utilizadas as normas de Vancouver para citações e referências bibliográficas. É de inteira responsabilidade dos autores a exatidão das referências bibliográficas, opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos. As referências devem ser numeradas em algarismos arábicos de acordo com a ordem em que aparecem no texto. As citações no texto devem ser identificadas com número da referência entre parênteses. As citações do tipo "comunicação

peçoal" ou "dados não publicados" devem ser evitadas, embora se reconheçam que, eventualmente, elas possam ser usadas. Nestes casos, elas devem ser citadas no texto e não na lista final de referências. As referências que consistem de artigos que foram "aceitos para publicação" ou "no prelo" são aceitáveis. No entanto, as referências dos artigos que são "submetidos" ou "em preparação" não são aceitas.

*Ao submeter o artigo, o autor correspondente assume que os demais autores estão cientes da sua participação no manuscrito

Declaração de Direito Autoral

A partir do momento que aceitos para publicação, os artigos passam a ser propriedade da Vittalle, sendo vedada tanto a reprodução – mesmo que parcial em outros periódicos – seja no formato impresso ou eletrônico, bem como, a tradução para outro idioma sem a autorização da Editoria Científica da Vittalle.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados neste periódico serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.