

Jennifer Naed Martins de Freitas

Presença de células CD57+, CD163+ e DNA Papilomavírus humano na cavidade oral de pacientes com leucoplasia e carcinoma epidermoide oral

Campo Grande  
2023

Jennifer Naed Martins de Freitas

Presença de células CD57+, CD163+ e DNA Papilomavírus humano na cavidade oral de pacientes com leucoplasia e carcinoma epidermoide oral

Dissertação apresentada para obtenção de título de mestre no Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias FAMED/UFMS, sob orientação da Profa. Dra. Inês Aparecida Tozetti.

Campo Grande  
2023

## **AGRADECIMENTOS**

Quero agradecer primeiramente, e principalmente, meus pais, “Papis” José e “Mamis” Vilma, tudo o que conquistei foi graças a vocês e para vocês. Obrigado por todo o apoio, confiança e carinho. Eu amo vocês.

À minha orientadora Dra. Inês Aparecida Tozetti, obrigada por aceitar me orientar, em especial em um período complexo que foi a pandemia. Agradeço de coração os puxões de orelha, o apoio e incentivo, cada ensinamento e palavra de sabedoria, todas as risadas, em especial as de nervoso encarando o citometria. Obrigado por acreditar em mim.

Ao LABIMUNOBIO, em especial as professoras Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira, Dra. Cacilda Tezelli Junqueira Padovani, Dra. Luana Soares e a Técnica MSc. Carla Braga Leite, e aos alunos, principalmente Daniel Camillo Fonseca Cavalcanti, Carlos Miguel Simões e Julia Oliveira Soares. Obrigado pela companhia, incentivo, pela troca de experiências e ensinamentos e por fazerem do laboratório um local acolhedor e incrível de se trabalhar.

Obrigada Dr<sup>a</sup> Simone Bertozi De Souza Vasconcelos por ceder as amostras para a realização deste trabalho e ao Dr. Carlos Eurico dos Santos Fernandes pela contribuição relacionada as análises estatísticas.

Ao Wellyngton Matheus De Souza Santiago, pelo apoio, paciência, troca de experiências, companhia e por embarcar nas ideias mesmo quando duvidosas. Você é um exemplo pra mim.

Aos meus amigos da vida pessoal, que a escola, a graduação e as aulas me deram, William Joel Saraiva Ramirez, Adrielle Paes de Barros Trava, Bianca Paes de Barros Trava, Gustavo Henrique Antonioli, Alex do Nascimento Franco, Gilmar Abreu e Natália Rodrigues meu mais sincero obrigada, parte do que sou hoje vem através do convívio com cada um de vocês. Agradeço por todo apoio ao longo dos anos, em especial os últimos meses, pois se existem pessoas que sabem o quanto eu amo o que eu faço essas pessoas são vocês que me ouvem falar sem parar. Obrigado por serem um porto seguro nesse mar de incertezas.

E a todos os meus professores, de escola, graduação e pós, em especial Ivan Benito meu professor de ciências e biologia no ensino fundamental e médio, o senhor que abriu meus olhos para a ciência e fez com que a aluna que odiava biologia viesse a se tornar bióloga.

## Resumo

O câncer orofaríngeo tem aumentado entre jovens e adultos nos últimos anos e tem como uma das principais causas a infecção por Papilomavírus humano (HPV), que é considerada uma Infecção sexualmente transmissível (IST). A leucoplasia é a lesão potencialmente neoplásica mais comum na cavidade oral apresentando grande risco para desenvolvimento de câncer epidermoide oral. As lesões na cavidade oral têm fatores de risco em comum, existindo a possibilidade de que a infecção por Papilomavírus humano (HPV) possa favorecer a transformação maligna nas diferentes lesões leucoplásicas e assim, progredindo para carcinoma epidermoide oral (CEO). O sistema imune é responsável pela eliminação do HPV na maioria das infecções, entretanto a persistência do vírus é fator predisponente para a transformação maligna das células infectadas. As células NK são responsáveis por eliminar células infectadas por vírus e células tumorais. Já os macrófagos podem ser ativados pela via clássica, onde são chamados de M1 e destroem microrganismos, desencadeiam a inflamação, ou pela via alternativa sendo denominados M2 ou macrófagos associados a tumor (TAM). O presente trabalho visou correlacionar a expressão de CD57 (células *Natural Killer* - NK) e CD163 (Macrófagos M2) à detecção de DNA de HPV em pacientes com leucoplasia e CEO. Os participantes foram selecionados no período de 2018 a 2020 nas Clínicas da Faculdade de Odontologia da UFMS e no Centro de Especialidades Odontológicas da Secretaria Municipal de Saúde de Campo Grande - MS. CEP/UFMS 2.621.049. Para a detecção do HPV por *Nested* PCR, foram coletadas células esfoliadas obtidas da superfície das lesões e após esta coleta, os pacientes foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para biópsia das lesões, utilizadas para histopatologia e imunohistoquímica. A frequência de detecção do DNA de HPV entre os participantes da pesquisa foi de 27,78% (10/36). As lesões foram classificadas como Epitélio Sem Displasia (n=6), Displasia Epitelial Discreta (n=7), Displasia Epitelial Moderada (n=9) e CEO (n=17). Em amostras classificadas histologicamente como CEO, a expressão de CD163 (macrófagos M2) foi maior (4456,32 cels/mm<sup>3</sup>), enquanto que a expressão de CD57 (células NK) foi menor (2741,05 cels/mm<sup>3</sup>). Não houve relação entre a positividade para DNA de HPV e a expressão de CD163 e CD57 (p>0,05). Não

houve relação entre a positividade para DNA de HPV e os resultados histopatológicos. Elevada expressão de CD163 e menor expressão de CD57 em tecidos com CEO representa um pior prognóstico considerando a atividade pró-tumoral dos macrófagos M2 e menor quantidade de células NK que poderiam eliminar as células tumorais contendo a progressão do tumor.

**Palavras-chave:** Cavidade Oral, Displasia epitelial e Imunohistoquímica.

## Abstract

Oropharyngeal cancer has increased among young people and adults in recent years and has as one of the main causes the human papillomavirus (HPV) infection, which is considered a sexually transmitted infection (STI). Leukoplakia is the most common potentially neoplastic lesion in the oral cavity, with a high risk for developing oral squamous cell cancer. The lesions in the oral cavity have risk factors in common, and there is the possibility that human papillomavirus (HPV) infection may favor malignant transformation in different leukoplastic lesions, thus progressing to oral squamous cell carcinoma (OSCC). The immune system is responsible for eliminating HPV in most infections, however the persistence of the virus is a predisposing factor for malignant transformation of infected cells. NK cells are responsible for eliminating virus-infected cells and tumor cells. Macrophages can be activated by the classical route, where they are called M1 and destroy microorganisms, triggering inflammation, or by the alternative route, being called M2 or tumor-associated macrophages (TAM). The present work aimed to correlate the expression of CD57 (Natural Killer - NK cells) and CD163 (M2 macrophages) to the detection of HPV DNA in patients with leukoplakia and CEO. The participants were selected in the period from 2018 to 2020 in the Clinics of the School of Dentistry of UFMS and the Center for Dental Specialties of the Municipal Health Secretariat of Campo Grande - MS. CEP/UFMS 2.621.049. For HPV detection by Nested PCR, exfoliated cells obtained from the surface of the lesions were collected and after this collection, patients underwent surgical procedures for biopsy of the lesions, used for histopathology and immunohistochemistry. The frequency of HPV DNA detection among the research participants was 27.78% (10/36). Lesions were classified as Epithelium Without Dysplasia (n=6), Discrete Epithelial Dysplasia (n=7), Moderate Epithelial Dysplasia (n=9) and CEO (n=17). In specimens histologically classified as CEO, the expression of CD163 (M2 macrophages) was higher (4456.32 cels/mm<sup>3</sup>), whereas the expression of CD57 (NK cells) was lower (2741.05 cels/mm<sup>3</sup>). There was no relationship between positivity for HPV DNA and the expression of CD163 and CD57 ( $p > 0.05$ ). There was no relationship between HPV DNA positivity and

histopathological findings. High expression of CD163 and lower expression of CD57 in tissues with CEO represents a worse prognosis considering the pro-tumor activity of M2 macrophages and lower amount of NK cells that could eliminate tumor cells containing tumor progression.

Keywords: Oral Cavity, Epithelial Dysplasia, Immunohistochemistry.

## **Lista de Tabelas**

- Tabela 1 Características sócio-epidemiológicas da população estudada e a relação com a positividade para DNA do HPV, Campo Grande, MS – 2022.
- Tabela 2 Características epidemiológicas sugestivas de risco, associadas à positividade para DNA do HPV, Campo Grande, MS – 2022.
- Tabela 3 Frequência absoluta e porcentagem das amostras segundo os achados histopatológicos, Campo Grande, MS- 2022.
- Tabela 4 Presença dos marcadores CD163 e CD57 segundo o tipo de lesão, entre a população estudada, Campo Grande, MS- 2022
- Tabela 5 Pacientes positivos para DNA de HPV segundo a classificação histopatológica e a média de células por mm<sup>3</sup> em relação à expressão de CD163 e CD57.



## Lista de Figuras

- Figura 1      Árvore filogenética baseada na sequência L1 ORF de 170 tipos de papilomavírus.
- Figura 2      Representação esquemática do genoma circular do HPV-16
- Figura 3      Organização do ciclo de vida do HPV
- Figura 4      Representação do genoma linear do HPV com as posições precoce (E) e tardia (L) e os locais de anelamento dos primers PGMY09/11 e GP5+/6+.
- Figura 5      Uso de preservativos entre os indivíduos do estudo, Campo Grande, MS-2022
- Figura 6      Frequência de positividade para HPV DNA entre as amostras estudadas. Campo Grande, MS -2022
- Figura 7      Expressão de CD163 e CD57 detectada por Imunohistoquímica em tonsila humana e biópsia da cavidade oral de pacientes atendidos na FAODO-UFMS e CEO, Campo Grande – 2022

## Lista de abreviaturas

AIDS = *Acquired Immuno-Deficiency Syndrome*

ANVISA = Agência Nacional De Vigilância Sanitária

CA = Carcinoma

CEO = Carcinoma Epidermoide Oral

CCEO = Carcinoma De Células Escamosas De Orofaringe

CD163 = *hemoglobin scavenger receptor*

CD57 = *HNK-1 antigen carbohydrate moiety*

CTL = *Cytotoxic T-Lymphocyte*

DED = Displasia Epitelial Discreta

DEM = Displasia Epitelial Moderada

DNA = *Deoxyribonucleic Acid*

ESD = Epitélio Sem Displasia

FDA = *Food and Drug Administration*

HIV = *Human Immunodeficiency Virus*

HPV= Papilomavírus humano

IL-1B- Interleucina 1 beta

IFN-  $\gamma$  = *Interferon-gamma*

IFN = interferon

IFN- $\alpha$  = *Interferon-alpha*

INCA = Instituto Nacional do câncer

IST = Infecções Sexualmente Transmissíveis

LCR = *Long Control Region*

MHC = *Major Histocompatibility Complex*

NK = *Natural Killer*

ORF = *Open Reading Frame*

PBS = *Phosphate Buffered Saline*

pRb = Proteína do retinoblastoma

PCR = *Polymerase Chain Reaction*

TAM = *macrófagos associados a tumor*

Th1 = Células T helper tipo 1

TNM = tumor-nódulo-metástase

VEGF = *Vascular endothelial growth factor*

VLP = *Virus like a particles*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1 Histórico.....	16
2.2 Epidemiologia do Câncer e do HPV na cavidade oral .....	17
2.3 Biologia do HPV.....	18
2.4 Fisiopatologia da lesão induzida pelo HPV .....	20
2.6 Métodos de identificação do HPV na mucosa oral .....	23
2.7 Resposta Imune.....	25
2.7.1 Macrófagos tipo 2, <i>Natural Killer</i> e a expressão de CD163 e CD57 .....	28
2.8 Imunoprofilaxia.....	29
<b>3 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>30</b>
3.1 Objetivos específicos .....	31
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>31</b>
4.1 Caracterização do estudo.....	31
4.2 Local da pesquisa .....	31
4.3 Participantes da pesquisa .....	31
4.9 Imunohistoquímica de marcação simples.....	34
4.9.1 Avaliação quantitativa das lâminas submetidas à técnica de imunohistoquímica .....	36
5.0 Dados secundários .....	36
6.0 Análise estatística .....	36
7.0 Aspectos éticos.....	37
<b>8.0 RESULTADOS .....</b>	<b>38</b>
8.1 Características epidemiológicas da população estudada.....	38
8.2 Achados histopatológicos.....	40
8.3 Análise Imunohistoquímica.....	42

<b>9. DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>10. CONCLUSÃO .....</b>	<b>48</b>
<b>11.LIMITAÇÕES DO ESTUDO.....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>
<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) .....</b>	<b>54</b>
<b>APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO SOCIOEPIDEMIOLÓGICO.....</b>	<b>56</b>
<b>APÊNDICE C- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP .....</b>	<b>58</b>
<b>APÊNDICE D – DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRA .....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE E- INFORME DE COLETA SESAU.....</b>	<b>63</b>

## 1 Introdução

Os casos de câncer orofaríngeo tem aumentado entre jovens e adultos nos últimos anos e tem como uma das principais causas a infecção por Papilomavírus humano (HPV). O HPV é considerada uma Infecção Sexualmente Transmissível (IST), apresentando grande risco para desenvolvimento de câncer epidermoide oral (CEO).

Através de microfissuras no epitélio o HPV infecta as células da camada basal do epitélio, podendo o DNA viral ficar na forma epissomal ou integrada. Quando na forma epissomal, também conhecida como reprodutiva, o DNA viral permanece na forma circular, e devido à ação dos genes E1 e E2 ocorre a replicação, podendo chegar a 100 cópias por célula.

Na forma integrada, o DNA viral se encontra linear e integrado no genoma da célula hospedeira. A quebra do DNA viral ocorre na região E2, induzindo assim uma maior produção de oncoproteínas E6 e E7. O aumento na produção destas oncoproteínas degrada as proteínas de Retinoblastoma (pRb) e p53, supressoras tumorais, fazendo com que as células infectadas sejam imortalizadas e que ocorra alterações na diferenciação e ciclo celular. As neoplasias e seu desenvolvimento ocorrem devido ao ciclo celular não estar regulado, de forma que o genoma viral está integrado ao da célula hospedeira, ao invés de estar na forma epissomal.

A leucoplasia é definida como uma placa branca aderente à mucosa, não removível por raspagem, podendo ter a superfície lisa, rugosa ou verrucosa. É o tipo de lesão mais frequente na cavidade bucal e se desenvolve em qualquer região, além disso, é considerada pré-neoplásica pois pode sofrer transformação maligna. O CEO, por sua vez, é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral. Tanto para a leucoplasia quanto para CEO, fatores internos e externos contribuem para um fenótipo maligno, como tabagismo, álcool, exposição à radiação ultravioleta e infecção por HPV.

O HPV tem diversas formas de evasão da resposta ao sistema imune, isso ocorre devido ao seu ciclo de vida ser exclusivamente intraepitelial, infectando os queratinócitos sem levá-los à lise celular, pois a proteína E6 se liga à proteína p53 degradando-a. Dessa forma não há ativação das células de Langerhans presentes

no epitélio e nem liberação de citocinas pró inflamatórias para migração de células apresentadoras de antígeno, logo que a infecção se estabelece. O vírus também inibe ação dos interferons tipo I, modulando negativamente a ativação dos mecanismos da imunidade inata.

A resposta imune ao HPV é muito importante, pois a persistência viral na célula infectada é um fator de risco para a progressão maligna. A imunidade inata é responsável pela primeira linha de defesa, portanto um elemento chave para a eliminação ou contenção da infecção.

As células NK são responsáveis por eliminar células infectadas por vírus e células tumorais, produzindo também importantes citocinas que induzem o perfil Th1 de resposta imune adaptativa. Os macrófagos por sua vez são responsáveis pela fagocitose de microrganismos, além de produzirem citocinas indutoras e reguladoras de inflamação. Os macrófagos podem ser ativados pela via clássica, onde são chamados de M1, destroem microrganismos e desencadeiam inflamação, e pela via alternativa, chamados M2 ou macrófagos associados a tumor (TAM). Os macrófagos M2 participam da progressão do tumor através da indução da resposta de Th2, inibindo as respostas de outras subpopulações de Thelper e TCD8+ e secretando fator de crescimento endotelial vascular e outros fatores pro-angiogênicos.

Mediante a importância da presença do HPV para a progressão neoplásica e a participação das células NK e macrófagos M2 na contenção da infecção viral ou progressão tumoral, o objetivo do presente trabalho foi correlacionar a presença dos marcadores CD163 e CD57 com a presença do HPV, em biópsia da cavidade oral de pacientes com leucoplasia e carcinoma epidermoide oral.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Histórico

Os antigos romanos e gregos já citavam as verrugas genitais em seus textos. No século XV, o interesse pelas verrugas e lesões genitais foi renovado devido a surtos de diferentes infecções sexualmente transmissíveis (IST) na época (ORIEL, 1971). Em 1893, Gémy estabeleceu a relação de verrugas genitais com as verrugas de pele, e em 1913 Jadassohn classificou os diferentes tipos de verruga e suas possíveis origens (GOODMAN, 1934; JADASSOHN, 1913; ORIEL, 1971).

No período que se seguiu diversos experimentos foram feitos para inocular verrugas genitais e de pele em diferentes animais, como coelhos e, em diferentes partes de corpo. Esses estudos eram feitos com verrugas maceradas e filtradas, tanto para saber se eram de origem viral como descobrir mais sobre em quanto tempo elas apareciam, seu crescimento e se e em quanto tempo desapareciam (GOODMAN, 1934; KIDD, 1938).

Devido a estudos como o de Goldschmidt e Kligman foi demonstrado que as verrugas possuíam características contagiosas, assim como crescimento e regressão (GOLDSCHMIDT; KLIGMAN, 1958). Houve também a observação não somente da transmissão através do ato sexual, mas a correlação entre a localização da verruga genital e as micro lesões provenientes do ato sexual. E por meio da microscopia eletrônica, em 1949 foram observadas partículas virais com arranjo cristalino em verrugas cutâneas (ORIEL, 1971; STRAUSS et al., 1949).

Nos trabalhos seguintes foram obtidos dados que demonstravam a existência de diferentes tipos de vírus dentro do grupo dos Papilomavírus humano (HPV), características moleculares e genéticas e sua associação com carcinoma de colo de útero (GISSMANN; HAUSEN, 1976; HAUSEN et al., 1974; ZUR HAUSEN, 1976).

Com o passar dos anos novos tipos de HPV foram sendo descobertos, e suas associações como a presença dos tipos HPV 6 e 11 com verrugas genitais preferencialmente, e HPV 16 e 18 em carcinomas cervicais. A presença de carcinomas associados ao HPV em outros sítios anatômicos também foi descrita. Atualmente temos descritos cerca de 170 tipos de HPV (DE VILLIERS, 2013).



## 2.2 Epidemiologia do Câncer e do HPV na cavidade oral

Foi estimado para o ano de 2020 a ocorrência de 377.713 novos casos de câncer oral no mundo e 98.412 de orofaringe, assim como 177.757 e 48.143 óbitos por estes tipos de câncer (SUNG et al., 2021).

Em um estudo sobre prevalência de infecção por HPV na cavidade oral realizado nos Estados Unidos com 5.579 pessoas, homens e mulheres de 14 a 69 anos demonstraram que a prevalência de HPV na população estudada era de 6,9% sendo 3,7% para HPV de alto risco oncogênico. Conforme o estudo realizado com homens e mulheres em Pittsburgh, Pensilvânia, a prevalência de HPV na cavidade oral foi de 10,2% na população estudada (GILLISON et al., 2012; RAGIN et al., 2011).

Na análise de Migaldi et al. (2012) realizado na Itália com esfregaço oral com pacientes do ambulatório da Clínica Oral e Departamento de Cirurgia Maxilo facial da Universidade de Modena, Itália, foi observado que 1,2% dos pacientes analisados apresentavam o DNA de HPV na cavidade oral.

Em uma pesquisa desenvolvida em clínicas odontológicas de Ibadan na Nigéria, 9,9% dos pacientes foram positivos para a presença do DNA de HPV na cavidade oral, apresentando mono ou co-infecção (FANEYE et al., 2022).

No trabalho realizado por Correnti, Rivera, e Cavazza (2004) na cidade de Caracas na Venezuela, amostras de lesões da mucosa oral de pacientes foram analisadas e 50% foram positivas para a presença de DNA de HPV.

De acordo com INCA, no Brasil é esperado o número de 11.180 novos casos de câncer oral em homens e de 4.010 em mulheres durante o triênio de 2020-2022. Este tipo de câncer é o quinto mais frequente em homens na região Centro-Oeste e o décimo terceiro em mulheres. No ano de 2020, 3.006 óbitos foram causados por câncer na região dos lábios, base da língua, assoalho da boca, amígdala e orofaringe, sendo que 240 óbitos foram na região Centro-Oeste (INCA, 2022). Em Mato Grosso do Sul, a estimativa para o ano de 2020 foi de 170 novos casos em homens sendo 60 deles na capital e de 50 novos casos em mulheres onde 20 deles são na capital (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2020).

Machado et al. (2014) em um estudo na cidade de Campo Grande – MS, no Brasil, através de esfregaços na mucosa oral de homens assintomáticos observou a presença do DNA de HPV em 1,3% das amostras estudadas. Em outro estudo, também realizado em Campo Grande – MS, com pacientes com idade igual ou superior a 30 anos, que utilizavam próteses dentárias, foi detectada a presença do DNA de HPV em 27,7% das amostras coletadas da cavidade oral (MACHADO et al., 2014; NASCIMENTO et al., 2019).

No Brasil, os sítios anatômicos relacionados ao câncer de lábio e cavidade oral são classificados pelo CID-10 pelos códigos C00 e C10, sendo eles: Lábios, base da língua, língua, gengiva, assoalho da boca, palato, outras partes e partes não especificadas da boca, glândula parótida, outras glândulas salivares maiores, amígdala e orofaringe (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER -INCA, 2021).

Fatores como tabaco e álcool são apontados como as causas mais comuns para o estabelecimento de tumores na região oral, também são fatores, a imunossupressão e exposição à radiação solar, entretanto, estudos vem demonstrando a relação do HPV e o surgimento das lesões nessas regiões. (ANDRADE; SANTOS; OLIVEIRA, 2015; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA, 2021).

Múltiplos parceiros sexuais, vida sexual iniciada precocemente, pratica de sexo orogenital e autoinoculação são fatores de risco associados à transmissão e à presença de HPV na região oral e orofaringe (CANDOTTO et al., 2017).

### **2.3 Biologia do HPV**

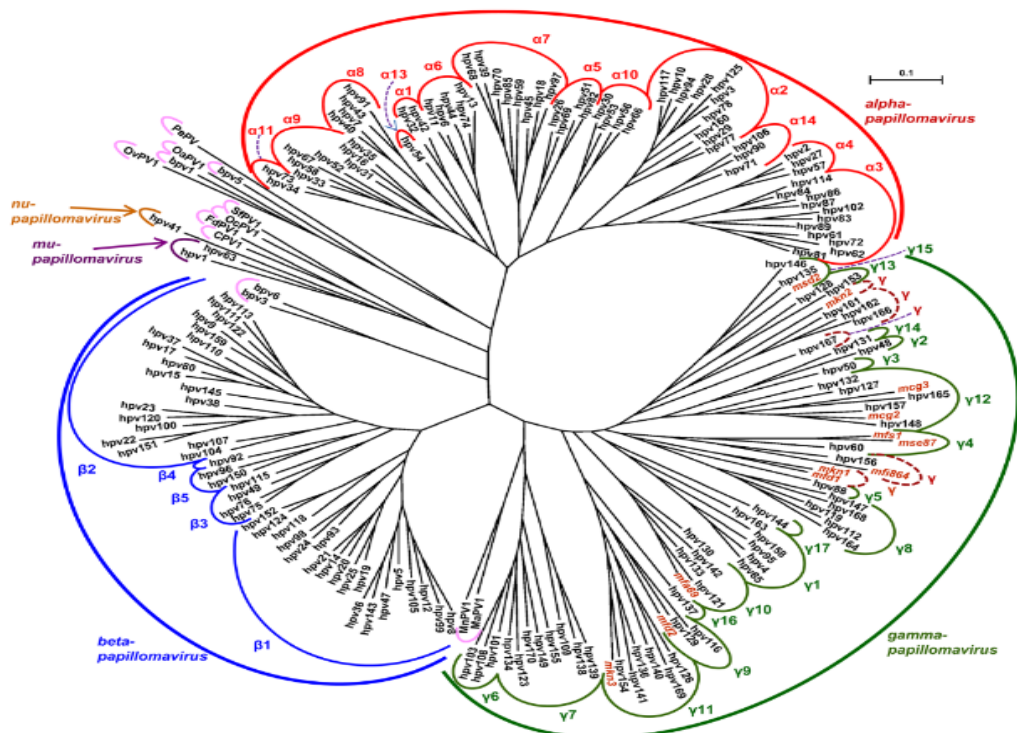
O Papilomavírus humano é da família *Papillomaviridae*, possui o diâmetro de 52-55nm, não envelopado, capsídeo icosaédrico com 72 capsômeros e uma fita de DNA circular com 8.000 pb (GENDEN et al., 2013; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005).

Atualmente são descritos mais de 200 tipos de HPV e são classificados de acordo com sua semelhança genética. A classificação dos tipos de HPV ocorre quando o genoma é completamente clonado e comparado com o gene L1 ORF

(*Open Reading Frame*) de um tipo já conhecido, pois este gene é o mais conservado. Quando a diferença é de 2% a 10% tem-se um novo subtipo e menos de 2% uma variante (DE VILLIERS et al., 2004; GENDEN et al., 2013).

Além disso, os tipos de HPV podem ser classificados de acordo com sua afinidade por tecidos, mucosotrópicos ou dermatrópicos, ou de acordo com seu potencial oncogênico, neste caso sendo classificados como de baixo ou alto risco oncogênico. Os tipos de HPV de alto risco oncogênico são 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, e são considerados de baixo risco oncogênico os tipos 6, 11, 13, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e 89. No gênero *Alpha-papillomavírus* estão presentes grande parte dos tipos de alto risco oncogênico, assim como os tipos responsáveis pelas lesões de baixo e alto risco oncogênico da mucosa oral. Na figura 1 podemos observar a árvore filogenética baseada na sequência L1 ORF de 170 tipos de papilomavírus (BRENTJENS et al., 2002; DE VILLIERS et al., 2004; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; NOBRE et al., 2010).

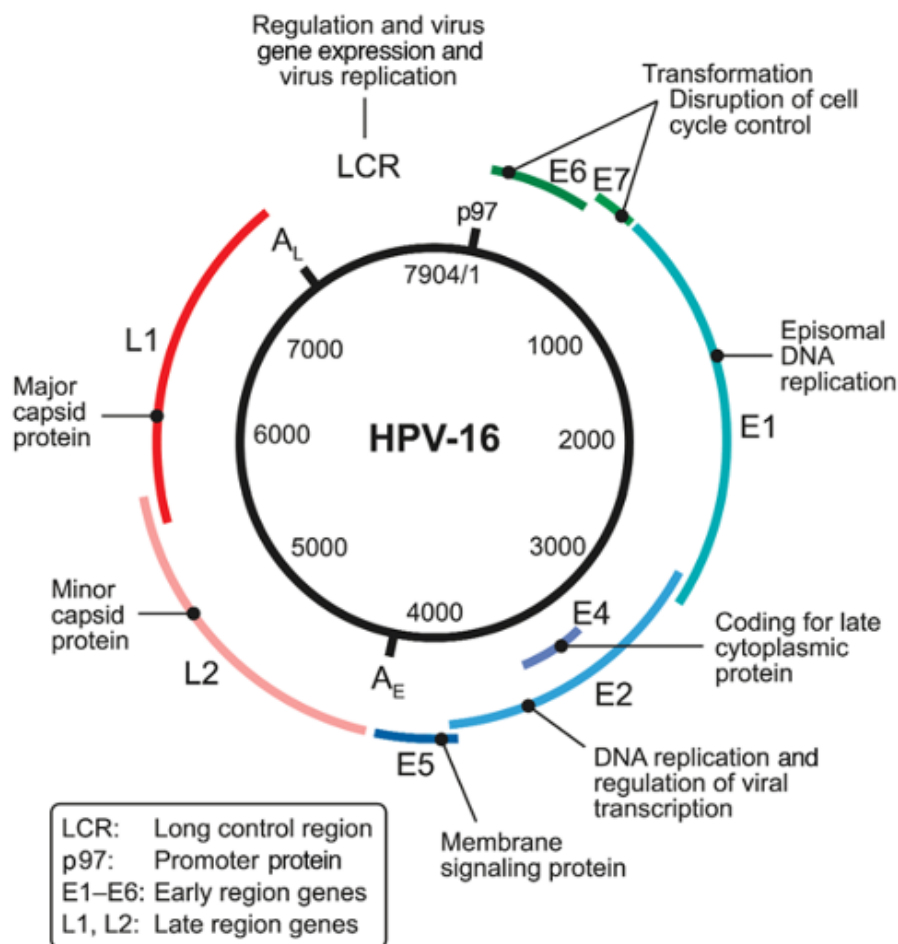
Figura 1 – Árvore filogenética baseada na sequência L1 ORF de 170 tipos de papilomavírus.



Fonte: De Villiers (2013)

No genoma do HPV, as ORFs são divididas em três partes: Região LCR, chamada região de controle longa onde contém elementos para replicação viral e transcrição, a região Early (E1-E7) ou precoce responsável por codificar proteínas que regulam a transcrição viral e também pela transformação oncogênica, e a região Late (L1 e L2) ou tardia que codifica as proteínas do capsídeo. Na figura 2 podemos observar a representação esquemática do genoma circular do HPV-16 (BRENTJENS et al., 2002; INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

Figura 2- Representação esquemática do genoma circular do HPV-16



Fonte: Rautava; Syrjänen, (2011)

## 2.4 Fisiopatologia da lesão induzida pelo HPV

O HPV utiliza como porta de entrada micro lesões no epitélio e infecta células epiteliais escamosas, e se liga a células basais através de receptores específicos da

superfície destas células. Além da pele, a boca, laringe, traqueia e esôfago podem ser acometidas pela infecção por HPV (BRENTJENS et al., 2002; SANCLEMENTE; GILL, 2002; TYRING, 2000).

O ciclo produtivo clássico do HPV é a adsorção, penetração, transcrição, tradução, replicação do DNA e maturação. Este ocorre quando é uma infecção permissiva, entretanto quando o ciclo da replicação normal é interrompido ocorre a infecção persistente (TYRING, 2000).

A infecção por HPV também pode se apresentar como latente, não apresentando manifestação micro ou macroscópica, mas com a detecção do DNA de HPV. Também podemos identificar a infecção subclínica, onde por meio da microscopia e colposcopia visualizam-se lesões, e a doença clínica, onde já existe comprometimento macroscópico do epitélio (BRENTJENS et al., 2002; TYRING, 2000).

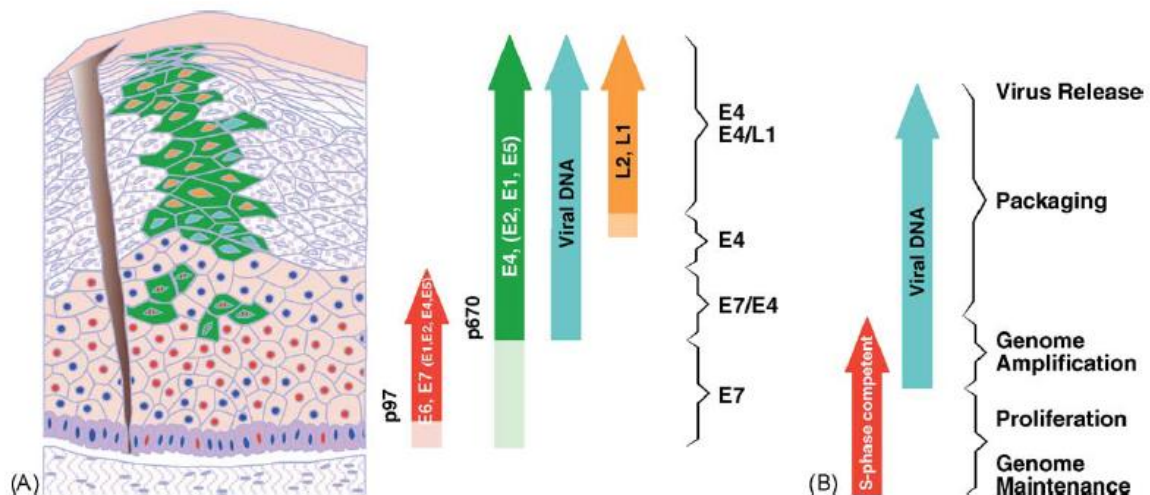
Após a infecção das células basais e a perda do capsídeo, o genoma viral pode ficar a parte do DNA da célula hospedeira como um episossoma, sendo transmitido à células filhas, ou integrar-se ao DNA da célula hospedeira e replicar-se. Quando isto ocorre leva a perda de função das proteínas E1/E2 e a desregulação de E6/E7. As proteínas E6 e E7 podem se associar a reguladores de ciclo celular como pRb e p53, estimulando a proliferação celular, progressão de fase S, e a não apoptose celular, permitindo assim acúmulo de erros na síntese do DNA da célula hospedeira (DOORBAR, 2005; SANCLEMENTE; GILL, 2002).

O potencial oncogênico dos tipos de HPV de baixo e alto risco podem estar ligados ao funcionamento das proteínas E6 e E7 sendo consideradas fatores predisponentes no desenvolvimento de canceres (DOORBAR, 2005).

As células-filhas infectadas migram para a camada mais externa do epitélio e se diferenciam de forma a suportar a expressão das proteínas estruturais e a replicação do DNA viral. Nas camadas epiteliais médias e superiores, o HPV amplifica seu genoma viral e o acondiciona em partículas a fim de formar virions infectantes. Para essa replicação é necessária a expressão de E4 e E5, assim como a ligação de E2 à região reguladora do HPV, recrutando a proteína E1 que atua como helicase para origem da replicação. As partículas virais são eliminadas nas

camadas basais superiores da mucosa ou epiderme. Na Figura 3 podemos observar a organização do ciclo de vida do HPV (DOORBAR, 2005; SCHEURER; TORTOLERO-LUNA; ADLER-STORTHZ, 2005; ZUR HAUSEN, 2002).

Figura 3 – Organização do ciclo de vida do HPV



Fonte: Doorbar (2005)

## 2.5 Principais lesões da cavidade oral

A leucoplasia é uma lesão oral definida como uma placa branca não removível através de raspagem, e pode apresentar superfície lisa, rugosa ou verrucosa. É a lesão mais frequente na cavidade bucal e sua origem está relacionada ao consumo de álcool, tabaco e exposição à radiação ultravioleta.

É a lesão oral potencialmente maligna mais comum na cavidade oral, com prevalência global variando de 0,5% a 3,46% (GISSI et al., 2018). A taxa média de transformação maligna para população total é de 3,5%, com uma ampla faixa compreendida entre 0,13% e 34,0% (WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016).

O risco de transformação maligna de uma leucoplasia oral está relacionado às suas características clínicas e locais. Além da localização da lesão, estão a idade avançada, sexo feminino, região geográfica do mundo, o tamanho da lesão e os diferentes graus (PINTO et al., 2020).

Na literatura temos controvérsias quando se considera o HPV como fator responsável por estas alterações bem como proliferação e diferenciação celular. A leucoplasia pode ou não apresentar displasia (SUNDBERG et al., 2019).

O carcinoma por sua vez é o tipo de tumor maligno mais comum na cavidade oral, além disso possui diferentes etiologias como : sexo, idade, tabagismo, etilismo exposição à radiação ultravioleta e infecção por HPV (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER -INCA, 2021; RODRIGUES et al., 2000; WARNAKULASURIYA; ARIYAWARDANA, 2016).

Cerca de 20% de pacientes com CEO na população ocidental não apresentam fatores de risco convencionais e estão relacionados a genótipos de HPV alto risco (BIXOFIS et al., 2015).

CEO HPV-positivos apresentam um comportamento menos agressivo, com um bom prognóstico, melhor resposta aos tratamentos, diminuição significativa do risco de morte e redução de recidiva (EZE; LO; BURTNESS, 2017).

## **2.6 Métodos de identificação do HPV na mucosa oral**

A detecção do HPV pode ser feita através de métodos morfológicos, moleculares e sorológicos, porém saber o sitio anatômico de onde se pretende fazer a detecção é importante para a escolha adequada do método.

Os métodos de detecção de HPV na mucosa oral podem ser morfológicos, como a análise indireta através da avaliação citológica e histopatológica por meio de avaliação clínica ou microscópica. Entretanto, o uso dessa técnica de forma exclusiva pode levar a resultados inconclusivos, por ser um local de frequentes traumas mecânicos. O método de inspeção com ácido acético também apresenta baixa especificidade devido à diluição do ácido pela saliva e por corar hiperqueratinizações causados por traumas (RAUTAVA; SYRJÄNEN, 2011).

Testes envolvendo a reação em cadeia de polimerase (PCR) para detectar o DNA viral são sensíveis e eficientes, porém o êxito desta técnica se torna dependente do local e da queratinização da lesão. Podem ser utilizados o método de enxágue da mucosa oral, onde apesar de fornecer uma alta qualidade de amostras não é possível saber o local exato de onde a célula infectada é proveniente. Também podemos utilizar o método de escovação, entretanto este método pode

gerar falsos-negativos em assintomáticos, devido à dificuldade de adquirir células basais ou parabasais infectadas, sendo importante escovar diversas áreas da boca (assoalho, vestibulos, mucosa, gengiva, borda e superfície da língua) para se ter amostra tanto dos epitélios queratinizados como não queratinizados (GAMA et al., 2021; RAUTAVA; SYRJÄNEN, 2011).

Para as detecções imunológicas se faz necessária a biópsia, onde apesar de permitir acesso a células com HPV em sua forma latente presente na camada basal, se torna um método de difícil acesso, seja pela necessidade do procedimento cirúrgico deixando o método caro e com baixa quantidade de proteínas expressas nos tecidos infectados e a falta de anticorpos específicos e sensíveis. (GAMA et al., 2021; VILLA; DENNY, 2006).

Testes de hibridização como *Southern* e *Northern blots* e amplificação de sinal também são bons métodos para detecção de HPV devido sua alta sensibilidade, mas podem ser demorados e necessitam de grande quantidade de ácidos nucleicos purificados (RAUTAVA; SYRJÄNEN, 2011; VILLA; DENNY, 2006).

Visto que o HPV não se propaga em culturas de tecidos, as técnicas de biologia molecular, como a PCR são uma opção precisa de identificação. Apesar de ser uma técnica cara e laboriosa, a aquisição da amostra utiliza métodos menos invasivos, por utilizar da escovação ao invés de biópsia. Os *primers* MY09/11 e GP5/GP6 tem sido amplamente utilizados para detecção do HPV através do PCR (GAMA et al., 2021; GRAVITT et al., 2000; VILLA; DENNY, 2006).

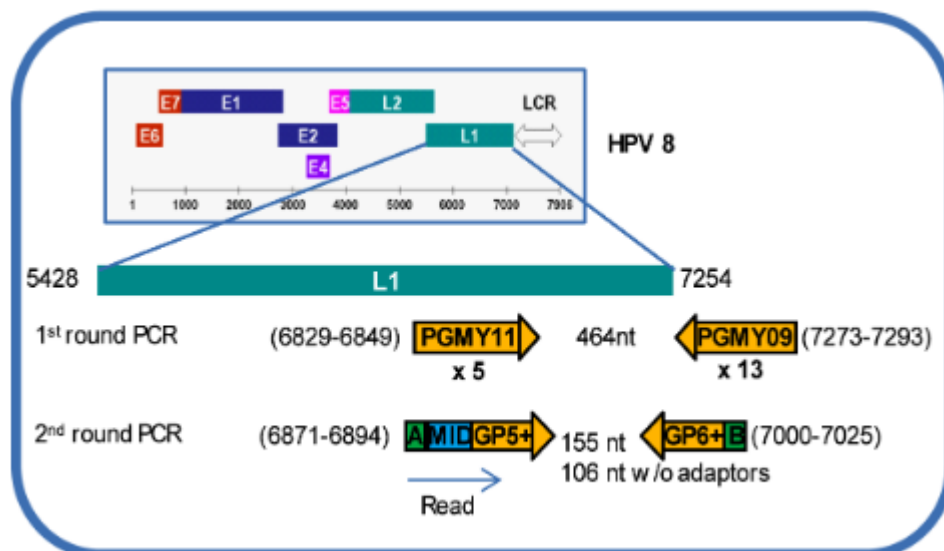
Os *primers* PGMY09/11 são uma versão modificada de MY09/11, e GP5+/6+ dos *primers* GP5/6, ambos os conjuntos foram projetados para se ligar de forma específica à sequência de nucleotídeos da região L1 do genoma viral, visto que representa uma região conservada entre os distintos tipos de HPV, essa sequência se mantém inalterada entre os diferentes tipos de HPV. O produto da PCR pode ser analisado em gel de agarose e também utilizado para sequenciamento (VILLA; DENNY, 2006).

Os *primers* PGMY09/11, que devido a região de anelamento dos *primers* ser conservada, o uso dos mesmos para amplificação por PCR permite a identificação de 37 genótipos de HPV, tanto de baixo como alto risco oncogênico, já os *primers*



GP5+/6+ tem um formato adequado para testes de alto rendimento (VILLA; DENNY, 2006). Na figura 4 podemos observar a Representação do genoma linear do HPV com as regiões precoce (E) e tardia (L) e os locais de anelamento dos primers PGMY09/11 e GP5+/6+. Neste caso é empregada a técnica de *Nested* PCR, onde se é feita uma PCR convencional com a amostra primária utilizando os primers PGMY09/11 e posteriormente a *Nested* PCR, onde se utiliza o produto amplificado da primeira reação de PCR e aplica-se os primers GP5+/6+ para uma amplificação interna aos primers PGMY09/11.

Figura 4- Representação do genoma linear do HPV com as regiões precoce (E) e tardia (L) e os locais de anelamento dos primers PGMY09/11 e GP5+/6+.



Fonte: Yin et al., (2016).

## 2.7 Resposta Imune

A resposta imune é dividida em inata e adaptativa. A resposta inata através da ação de Macrófagos e células NK (*Natural Killer*) é importante para eliminação de células infectadas por vírus, assim como a resposta adaptativa baseada em células T citotóxica e células B. Entretanto, acredita-se que quimiocinas e citocinas secretadas por células presentes no estroma, como Macrófagos, células NK, Células Dendríticas e Fibroblastos podem contribuir para a carcinogênese (SUBBARAYAN et al., 2019).

Após a entrada do vírus nas células basais do hospedeiro, os genes E1 e E2 começam a ser expressos, estes são fatores de replicação, e irão recrutar polimerases celulares e proteínas acessórias. Conforme as células infectadas vão se dividindo, o genoma viral vai sendo distribuído. Uma célula filha migra para as camadas suprabasais, e inicia a expressão viral tardia por meio das proteínas L1 e L2 que posteriormente vão dar molde a partículas virais, que serão liberadas quando alcançarem as camadas superiores do epitélio(KANODIA; FAHEY; KAST, 2007).

Não são todos os casos de indivíduos infectados por HPV que desenvolvem câncer, pois para que isso ocorra é necessária a integração do DNA do HPV na célula do hospedeiro. Esse evento pode ter como uma das prováveis causas a co-evolução do vírus e do hospedeiro juntamente com as formas de escape viral para não ser detectado pelo sistema imunológico. Parte das formas de escape do HPV estão relacionadas a genes importantes, E6 e E7, onde uma de suas funções é induzir a degradação de p53 e retinoblastoma que são importantes supressores tumorais (HASAN et al., 2007; KANODIA; FAHEY; KAST, 2007)

O HPV não tem ciclo lítico, logo ele não provoca sinais pró-inflamatórios ativando e recrutando células dendríticas para o local, e estes sinais são importantes para indução da resposta imune no epitélio. Além disso, apenas quantidades muito pequenas do vírus replicantes são expostas ao sistema imune, a maioria das partículas virais não ficam no local e por isso não alcança a circulação sistêmica, dessa forma ele consegue ficar invisível ao hospedeiro por muito tempo. Logo, uma das primeiras estratégias do HPV para evitar a detecção é manter um perfil baixo de replicação (HASAN et al., 2007; KANODIA; FAHEY; KAST, 2007).

O reconhecimento do antígeno específico pelo sistema imune do hospedeiro é necessário para a eliminação do vírus, entretanto, o HPV consegue escapar ao sistema imune ao ser capaz de mimetizar proteínas do hospedeiro, como é o caso da proteína E7 que tem semelhança com várias proteínas humanas presentes em processos reguladores importantes. Também se acredita que o compartilhamento de epítopos seja um mecanismo de escape desenvolvido pelo HPV (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007)

A persistência da infecção viral é importante na carcinogênese induzida por vírus, assim como a desregulação imunológica. Uma das formas que o HPV tem de

atrapalhar o funcionamento do Sistema imune, é que os tumores associados ao HPV possuem perda de expressão de moléculas do MHC de classe I, pois E7 regula a transcrição de genes envolvidos na apresentação de antígenos, reduzindo os peptídeos virais da superfície de células infectadas e auxiliando o vírus a escapar de células T citotóxicas e NK (HASAN et al., 2007; KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; SANCLEMENTE; GILL, 2002; SUBBARAYAN et al., 2019).

As células *Natural Killer* (NK) são um dos componentes da imunidade inata, apresentam um citoplasma granular e reconhecem de forma não específica células infectadas e células tumorais, destruindo-as. As NK secretam IFN- $\gamma$  que ativam os macrófagos, enquanto IL-15, IFN tipo I e IL-12 são citocinas capazes de ativar as NK (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

Os interferons (IFN) são fatores solúveis, podem atrair ou ativar células do sistema imunológico e limitam infecções virais líticas e não líticas. Dados sugerem que o HPV consegue evitar os efeitos do IFN tipo I, onde o IFN- $\alpha$  não inibe a transcrição de E6/E7. (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007)

Citocinas e quimiocinas são importantes para a liberação de proteínas que medeiam a resposta imune às infecções. As proteínas E6 e E7 do HPV podem inibir algumas quimiocinas, como MCP-1 e interleucinas como IL-1B e IL-6, estas são responsáveis por atrair células como Monócitos, Macrófagos, células NK e células T de memória que são relevantes para a eliminação de infecções virais. As proteínas E6 e E7 podem regular negativamente a transcrição do promotor de IL-8. E6 também pode regular negativamente a expressão de IL-18 por meio da via p53, e impedir a indução de IFN-gama. Como IL-18 aumenta sinergicamente a produção de IFN- $\gamma$  em células NK, a regulação negativa de IL-18 impede a função citolítica das NK (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; SUBBARAYAN et al., 2019).

Outra forma de escape do HPV é desfavorecer a indução da resposta Th1, essas produzem IL-2 e IFN- $\gamma$  que atuam na eliminação do vírus. Ao inibir células Th1 que favorecem o desenvolvimento de CTL, o vírus impede o hospedeiro de eliminar a infecção (KANODIA; FAHEY; KAST, 2007).

Os Macrófagos são responsáveis por produzirem citocinas que regulam e induzem a inflamação, fagocitam e destroem organismos, removem tecidos mortos e

iniciam o processo de reparação tecidual. Os macrófagos podem ser ativados pela via clássica, por meio de TLR e pela IFN- $\gamma$ , sendo chamados de macrófagos tipo 1 ou M1. Outra forma de ativação dos macrófagos é a via alternativa, induzido por IL-4 e IL-13, dando origem aos macrófagos tipo 2 ou M2. Os macrófagos associados a tumor (TAM), também conhecidos como macrófagos tipo 2, através da indução da resposta Th2, tem participação na progressão do tumor, secretando VEGF e inibindo a resposta de TCD4+ e TCD8+(ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019; KANODIA; FAHEY; KAST, 2007; SANCLEMENTE; GILL, 2002; SUBBARAYAN et al., 2019).

Maior quantidade de TAM no estroma induz maior liberação de STAT3 (Signal. Transducer and Activator of Transcription 3), que controla processos celulares como a proliferação e a sobrevivência, prejudicando a resposta adaptativa e propiciando a gênese e metástase carcinogênica, desta forma os TAM estão ligados ao mau prognóstico de doenças, metástase locorregional e lesões de grau elevado (SUBBARAYAN et al., 2019).

As células infectadas pelo HPV produzem um microambiente de quimiocinas e citocinas (IL1B, IL-6, IL-8, TGFB, CXCL12 e BFGF) que induzem a mutação dos fibroblastos em câncer associado a fibroblasto (CAF), contribuindo com que células infectadas por HPV se tornem e mantenham-se neoplásicas, tendo como resultado, crescimento, invasão e progressão(SUBBARAYAN et al., 2019).

### **2.7.1 Macrófagos tipo 2, *Natural Killer* e a expressão de CD163 e CD57**

Os macrófagos são células efetoras imunes importantes, pois são um dos principais componentes a se infiltrarem nos tumores. Derivado dos monócitos sanguíneos, os macrófagos podem se dividir em subpopulações, as classicamente ativadas M1 ou as alternativamente ativadas dentro do microambiente tumoral, os M2 (CHEN et al., 2017). O tipo M1 promove resposta inflamatória e o tipo M2 suprime a inflamação, mas também pode promover o crescimento do tumor (SWANGPHON et al., 2017).

Quando presentes no tecido canceroso, os macrófagos são chamados de macrófagos associados ao tumor (TAM). Os TAMs são importantes em vários tipos de câncer, incluindo CCEO. Os macrófagos M2 possuem marcadores

característicos, incluindo um receptor de hemoglobina denominado CD163 (SHIGEOKA et al., 2020)

A molécula CD57 (HNK-1, Leu7) é um antígeno de superfície de cadeia carboidrato sulfatado e costuma ser expresso em células NK células e células T diferenciadas. A expressão de CD57 torna as células NK mais citotóxicas e reativas à sinalização via CD16, favorecendo a morte de células alvo (DE RUITER et al., 2022; ELAHI; RAKHSHAN, 2020).

## 2.8 Imunoprofilaxia

A vacina é uma medida profilática contra o HPV. Existem duas vacinas aprovadas tanto pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos Estados Unidos quanto pela ANVISA no Brasil, a Cervarix® eficaz contra HPV de alto risco oncogênico 16 e 18 e a Gardasil® que garante proteção aos tipos 16 e 18 de alto risco oncogênico, mas também aos de baixo risco oncogênico 6 e 11. (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; SATHISH; WANG; YUAN, 2014).

Tanto a vacina Gardasil quanto a Cervarix foram projetadas utilizando-se de auto montagem e expressão recombinante da proteína L1 em VLP (*vírus like a particles*, em português: partícula semelhante a vírus), de forma que não contém DNA e não são infecciosas. Sua função é ser profilática, segura e provocar uma resposta específica forte (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007).

No Brasil a vacina contra o HPV é fornecida pelo Ministério da Saúde, a distribuição iniciou em março de 2014, onde a primeira dose foi ofertada para meninas de 11 a 13 anos, e 6 meses depois, para aquelas que completavam até 14 na segunda dose, utilizando-se em ambos os casos a vacina quadrivalente (Gardasil). O público alvo foi ampliado nas seguintes ocasiões: estendo a vacinação para mulheres de 14 a 26 anos vivendo com HIV e síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), e no ano de 2017 através de uma nota informativa do Ministério da Saúde meninos de 11 a 14 anos foram incluídos como público alvo. Atualmente no calendário vacinal adolescente de 2022 disponibilizado pelo ministério da saúde,

meninos e meninas de 9 a 14 anos podem tomar a vacina quadrivalente contra o HPV (BRASIL, 2022, 2015, 2017).

As vacinas contra o HPV foram elaboradas pensando em prevenir a infecção pelos tipos 16, 18, 6 e 11, e diminuir a incidência do câncer cervical, vaginal, anal, peniano e vulvar além da incidência de verrugas genitais, de pele e laringe papilomatosa. Entretanto, ainda não se tem estudos o suficiente para analisar sua eficácia na redução da infecção oral por HPV (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2007; SATHISH; WANG; YUAN, 2014)

Estudos relataram a indução de anticorpos específicos em quantidade detectável na cavidade oral um mês após a administração de Gardasil e a eficácia contra infecções orais de HPV em mulheres, 4 anos após a vacinação com Cervarix. Esses estudos demonstram que o uso da vacina pode auxiliar em uma proteção contra a infecção por HPV na cavidade oral pelos tipos de alto risco 16 e 18 (AHN et al., 2018; HERRERO et al., 2013; PARKER et al., 2019; PINTO et al., 2016).

A resposta imune consiste então em elemento chave para o controle ou disseminação e prevenção da infecção. A higidez do sistema imune é processo chave para a condução do processo para a eliminação do vírus.

Tendo em vista a necessidade de estudos relacionados à resposta imunológica na infecção por HPV na cavidade oral, se torna necessário um melhor entendimento sobre a presença das células e suas possíveis relações no microambiente infectado. Assim, a detecção por imunohistoquímica dos marcadores CD57 em células NK e CD163 em macrófagos M2 pode contribuir para um melhor entendimento sobre o papel destas células no microambiente infectado pelo HPV na cavidade oral e sua possível relação com leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca.

### **3 Objetivo geral**

Correlacionar a presença dos marcadores CD163, CD57 e a presença do DNA de Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide oral.

### **3.1 Objetivos específicos**

Identificar os marcadores fenotípicos CD163 e CD57 e associar com a presença de DNA de HPV em biopsias de leucoplasia e carcinoma epidermoide oral.

Associar os marcadores CD163 e CD57 no estroma de biopsias da cavidade oral e relacionar com a classificação histopatológica da lesão.

## **4 Metodologia**

### **4.1 Caracterização do estudo**

Este estudo trata-se de 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.

### **4.2 Local da pesquisa**

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios (LABIMUNOBIO) do Instituto de Biociências (INBIO), da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande - MS.

### **4.3 Participantes da pesquisa**

As amostras e dados utilizados nesse estudo foram provenientes de pacientes participantes do estudo “Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca: relação com biomarcadores de proliferação celular, de diferenciação e com marcadores fenotípicos da resposta imunológica no prognóstico das lesões”. Os pacientes participantes foram selecionados durante

atendimento nas clínicas da FAODO e no Centro de Especialidades Odontológicas (CEO) da Secretaria Municipal de Saúde (SESAU) de Campo Grande - MS, durante o período de julho de 2018 a dezembro de 2020. 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 epidermoide oral (CEO) e que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido(TCLE)(apêndice A). Critérios de exclusão: gestantes e pacientes com alterações cognitivas.

#### **4.4 Coleta de células da cavidade oral para detecção de HPV DNA**

Para a detecção do HPV, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), células da cavidade oral foram coletadas por meio de 5 -10 gentis escovações . Foram obtidas de cada participante duas amostras: uma da superfície da lesão e outra de superfície das demais regiões da mucosa oral sem alteração. Após a coleta, as escovas utilizadas foram deixadas em tubos com tampão fosfato pH 7,4 e mantidas em freezer a -20°C até o momento da extração.

#### **4.5 Biópsia das lesões orais**

Após a coleta para detecção do HPV, os pacientes foram submetidos a procedimentos cirúrgicos para biópsia das lesões seguindo rotina adotada nos atendimentos das Clínicas Odontológicas para o diagnóstico histopatológico das lesões. Para a análise histopatológica e imunohistoquímica, as amostras foram obtidas por biópsia incisional, utilizando anestesia infiltrativa com octopressin 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.

#### **4.6 Extração de DNA**

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) onde as amostras foram lisadas com o tampão de lise, contendo detergente SDS 10% e adicionou-se a Proteinase K (20mg/ml), submetidas a banho-maria seco a 37°C, por 1 hora e 30 minutos. Com fenol/clorofórmio e centrifugadas, retirando-se o sobrenadante e em outra etapa foram acrescentados acetato de sódio 5M (pH 3,00) e álcool absoluto gelado; incubados por 12 horas em -20°C, lavadas em álcool 70% e desidratadas em banho-maria seco e por fim reidratadas em TRIS-EDTA Ph 7,5, permanecendo na geladeira por 24 horas, depois armazenadas a -20°C.

#### **4.7 Detecção do DNA de HPV**

Para um controle endógeno da reação de PCR, foram utilizados os *primers* direcionados à parte da região gênica que codifica para cadeia de  $\beta$ -globina Humana, PC04 e GH20, amplificando um fragmento de 286pb, presentes no DNA humano (BAUER et al., 1991) e para detectar a presença do DNA do HPV nas amostras, utilizou-se um *pool* de *primers* PGMY 09/11 (GRAVITT et al., 2000) que amplifica um fragmento de 450pb do genoma viral, os *primers* GP5+ e GP6+ (QU et al., 1997) que direcionam para a amplificação de um fragmento de 150pb, ambos direcionados à região L1 (*Late 1*) do genoma viral. Foram utilizados para a 2ª amplificação (*Nested-PCR*), utilizando-se como molde na reação o produto da primeira amplificação.

Em capela de fluxo laminar, foi preparada uma solução contendo: Tampão para PCR Tris-EDTA pH 8,4 [10X]; dNTPs 2,5mM; MgCl<sub>2</sub> 3,5 mM; enzima Taq DNA polimerase; *primer* para HPV PGMY09/11 10pmol/ $\mu$ l, *primer* para  $\beta$ -globina PCO4/GH20 10pmol/ $\mu$ l e água ultrapura estéril. A um volume final de 45 $\mu$ l de solução foi adicionado 5 $\mu$ l do DNA 50ng/ $\mu$ l, recuperado de cada amostra, a reação ocorreu 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 a -20 °C até que fossem submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Foi separada uma alíquota de 2 $\mu$ l dos produtos da amplificação com os *primers* PGMY (+/-) desde que apresentassem o produto correspondente à

amplificação de parte do gene  $\beta$ -globina e então adicionada ao volume final de 23 $\mu$ l da seguinte solução preparada em capela de fluxo laminar: tampão para PCR Tris-EDTA pH 8,3 [10X]; MgCl<sub>2</sub> 50mM; dNTPs 2,5mM; enzima Taq polimerase; *primer* para HPV GP5+ 10mM; *primer* para HPV GP6+ 10mM; água ultrapura.

Esta reação 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 a -20 °C, até que fossem submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%.

#### **4.8 Detecção dos produtos da PCR**

Foram pipetados 8 $\mu$ l do produto da PCR e adicionados a 3 $\mu$ l da solução tampão de amostra de azul de bromofenol. A mistura obtida foi aplicada no gel de agarose 1,5%. Foram aplicados no mesmo gel 5 $\mu$ l do marcador de massa molecular (100bp). A fonte foi ajustada para 100V, por uma hora. Após a corrida eletroforética, 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*.

#### **4.9 Imunohistoquímica de marcação simples**

As lâminas com cortes histológicos das amostras foram submetidas à técnica de marcação simples por imunohistoquímica para identificação de Macrófagos M2 e Células com características morfológicas de NK, identificando a expressão de CD163 e CD57, respectivamente. Para revelação da reação de imunohistoquímica, foi utilizado o sistema *HiDef Detection<sup>TM</sup>* (*Cell Marque, Rocklin, CA, USA*), composto por dois reagentes, descritos a seguir como reagentes 1 e 2. Controles positivos (com adição de anticorpos primários) e negativos (sem adição dos anticorpos primários) foram desenvolvidos utilizando-se cortes histológicos de tonsila humana.

Os cortes histológicos de 3 $\mu$ m de espessura foram obtidos a partir de material embebido em parafina e depositados em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropyltriethoxi-silano (*Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, EUA*). A

desparafinização do material foi realizada em estufa a 60°C por 24 horas e posterior banho em xilol, por 30 minutos, a 60°C. Posteriormente, os cortes foram hidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 80%, 50%) por 30 segundos em cada banho e submetidos à recuperação antigênica em calor úmido com tampão TRIS EDTA 10 mM (pH 9,0). As lâminas permaneceram sob alta pressão por dois minutos e meio.

Após resfriamento dos cortes por 20 minutos, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com um banho de 30 minutos com Klear dual block (GBI Labs, Washington, USA) e seguido de um banho de 30 minutos em soro bovino fetal a 2%. Em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e em PBS (*Phosphate Buffered Saline*) (pH 7,2), por 5 minutos.

Os anticorpos anti-CD163 (Abcam, Cambridge, UK –Rabbit monoclonal clone: EPR19518) e anti-CD57 (Abcam, Cambridge, UK –Mouse monoclonal [NK/804] clone: ab212408) foram diluídos de acordo com as instruções do fabricante. Aplicou-se 100 µL do anticorpo diluído em cada lâmina que foi incubada em câmara úmida à temperatura de 25° por 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS para remoção do anticorpo não ligado.

Em seguida, duas gotas do reagente Amplificador (reagente 1) foram aplicadas sobre o tecido e a ser incubado durante 20 minutos em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, mais duas gotas do reagente Polímero / HRP (reagente 2) foram aplicadas e foi feita a incubação durante 20 minutos, seguido de nova lavagem.

A solução de Diaminobenzidina (DAB) (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil) foi preparada conforme instruções do fabricante. Foram aplicados 100 µL desta solução sobre as lâminas, posteriormente incubadas por 10 minutos. Decorrido o tempo de incubação, os espécimes foram lavados cuidadosamente com água deionizada, recolhendo-se o resíduo em recipiente plástico para posterior descarte junto a materiais de risco biológico, e contra-corados em hematoxilina de Harris. Por fim, os cortes foram desidratados com banhos em concentrações crescentes de etanol (50%, 80%, 95% e 100%) e 3 banhos de xilol por 30 segundos cada. As lamínulas foram adicionadas sobre as lâminas com Entelan® (Merck Millipore, Darmstadt, HE, Germany) para posterior análise.

#### **4.9.1 Avaliação quantitativa das lâminas submetidas à técnica de imunohistoquímica**

As lâminas foram fotodocumentadas pela câmera fotográfica digital Moticam 2300 3.0 Megapixels acoplada ao microscópio óptico Nikon Eclipse E200, utilizando-se aumento de 400x. Para a captura das imagens, foi utilizado o programa Motic Images Plus 2.0 e, para quantificação das células imunomarcadas, o software de análise de imagem digital *ImageJ* do *National Institutes of Health*, EUA com o pacote de “plug-ins” desenvolvido pela Universidade MacMaster (<http://www.macbiophotonics.ca/imagej>).

Foram capturadas 10 imagens de cada lâmina com imunomarcação para CD163 e CD57, com tamanho de 1024x768 pixels e com barra de escala de 10µm padronizada à marca do microscópio utilizado. A partir da barra de escala, o tamanho das imagens foi convertido de pixels para µm no software *ImageJ*, utilizando-se a ferramenta *freehand line*. Foram contadas as células imunomarcadas em cada uma das imagens, utilizando-se o plugin *Cell Counter* do software *ImageJ*. Foi calculada a média das contagens das 10 imagens, expressa pela quantidade de células imunomarcadas por mm<sup>3</sup>.

### **5.0 Dados secundários**

Os dados secundários, tais como Classificação Histopatológica da Lesão e dados sócio-comportamentais (idade, sexo, hábitos e etc) foram obtidos do projeto “Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca: relação com biomarcadores de proliferação celular, de diferenciação e com marcadores fenotípicos da resposta imunológica no prognóstico das lesões”.

### **6.0 Análise estatística**

A análise estatística foi desenvolvida usando o programa estatístico SPSS 10.0. As tabelas de frequência foram analisadas utilizando o teste  $\chi^2$ , com 95% de intervalo de confiança. A correlação entre os resultados do exame histopatológico e da imunohistoquímica foi calculado pelo teste de Kruskal Wallis.

## **7.0 Aspectos éticos**

O projeto “Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca: relação com biomarcadores de proliferação celular, de diferenciação e com marcadores fenotípicos da resposta imunológica no prognóstico das lesões” 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. O descarte do material foi realizado segundo o plano de gerenciamento de resíduos sólidos da UFMS – 2019 (FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL, 2019).

## 8.0 RESULTADOS

### 8.1 Características epidemiológicas da população estudada

Para a realização deste estudo participaram 36 pacientes de ambos os sexos sendo 9 mulheres (25%) e 27 homens (75%) com idade média de 56 anos (35-84). Destes pacientes foram obtidas 39 amostras de biopsia de lesões orais, onde 3 pacientes tinham mais de uma lesão oral, de forma que foram coletadas amostras de todas as lesões.

Entre os pacientes, a positividade para DNA de HPV foi de 10/36 (27,78%) sendo 2 mulheres (5,56%) e 8 homens (22,22%). As características sócio-epidemiológicas e a positividade para DNA de HPV podem ser observadas na tabela 1 ( $p>0,05$ ).

Tabela 1 – Características sócio-epidemiológicas da população estudada e a relação com a positividade para DNA do HPV, Campo Grande, MS – 2022.

Variável	total		HPV-DNA (-)		HPV-DNA (+)	
	N°	%	N°	%	N°	%
<b>Idade (anos)</b>						
≤ 40	4	11,11	3	8,33	1	2,78
≥ 41	19	52,78	14	38,89	5	13,89
≤ 60	13	36,11	9	25,0	4	11,11
<b>Escolaridade</b>						
Analfabetos	4	11,11	1	2,78	3	8,33
Fundamental incompleto	2	5,56	1	0,0	1	5,56
Fundamental completo	18	50,0	15	41,67	3	8,33
Médio completo	9	25,0	7	19,44	2	5,56
Superior completo	3	8,33	2	2,78	1	5,56
<b>Estado civil</b>						
Solteiro(a)	9	25,0	6	16,67	3	8,33
Casado(a)	21	58,33	15	41,67	6	16,67
Separado(a)	4	11,11	3	8,33	1	2,78
Viúvo(a)	2	5,56	2	5,56	0	0,0

$p>0,05$ . (Não houve significância estatística)

As características epidemiológicas sugestivas de risco à infecção da população estudada e a relação com a positividade para DNA de HPV pode ser observada na Tabela 2 ( $p>0,05$ ).

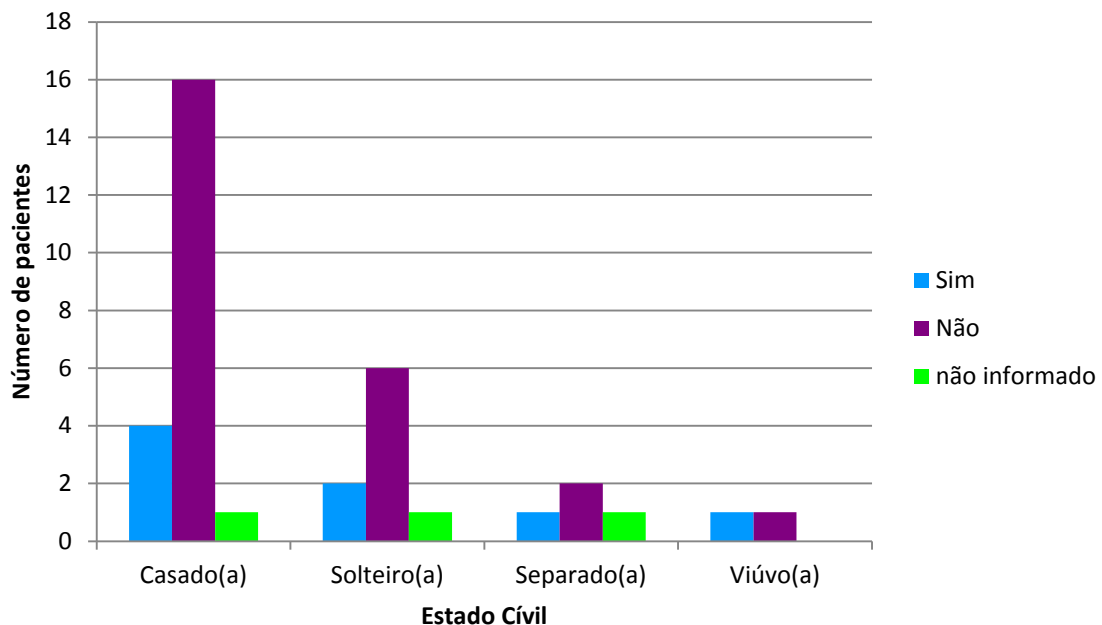
Tabela 2 – Características epidemiológicas sugestivas de risco de infecção associadas à positividade para DNA do HPV, Campo Grande, MS – 2022. ( $p>0,05$ ).

Variável	Total		HPV-DNA(-)		HPV-DNA(+)	
	N°	%	N°	%	N°	%
<b>Preservativo</b>						
Sim	9	25,0	7	19,44	2	5,56
Não	24	66,67	16	44,44	8	22,22
Não informado	3	8,33	3	8,33	0	0,0
<b>Sexo Oral</b>						
Não	22	61,11	15	41,67	7	19,44
Sim	9	25,0	7	19,44	2	5,56
Não informado	5	13,89	4	13,89	1	0,0
<b>Tabaco</b>						
Não	16	44,44	13	36,11	3	8,33
Sim	20	55,56	13	36,11	7	19,44
<b>Álcool</b>						
Não	16	44,44	11	30,56	5	13,89
Sim	19	52,78	14	38,89	5	13,89
Não informado	1	2,78	1	2,78	0	0,0
<b>Parcerias sexuais desde a primeira relação</b>						
1 pessoa	3	8,33	0	0,0	3	8,33
1 a 10	10	27,78	8	22,22	2	5,56
Acima de 10	3	8,33	1	2,78	2	5,56
Não informado	20	55,56	17	47,22	3	8,33
<b>Parcerias sexuais nos últimos dois anos</b>						
1 pessoa	19	52,78	14	38,89	5	13,89
Mais que 1	7	19,44	6	16,67	1	2,78
Não informado	10	27,78	6	16,67	4	11,11

$p>0,05$ .(Não houve significância estatística)

Em relação ao uso de preservativos observou-se que 66,67% dos indivíduos informaram não fazer uso de preservativos. A frequência do uso do preservativo segundo o estado civil é apresentada na figura 5 ( $p>0,05$ ).

Figura 5 – Uso de preservativos entre os indivíduos do estudo segundo o estado civil, Campo Grande, MS-2022



$p>0,05$ . (Não houve significância estatística)

Entre os pacientes, 11,11% relataram possuir alguma IST sendo principalmente Gonorreia e Sífilis. 83,33% Relataram não ter ocorrido episódios de IST e 5,56% não respondeu ou não sabia.

A prática de sexo oral foi confirmada por 25% dos pacientes e negada por 61,11%. Dentre os participantes 13,89% não responderam.

## 8.2 Achados histopatológicos

Foram analisadas 39 amostras biopsiadas da cavidade oral, estas foram classificadas em quatro grupos de acordo com suas características histopatológicas.



Na tabela 3 observamos a frequência absoluta e porcentagem das amostras segundo os achados histopatológicos.

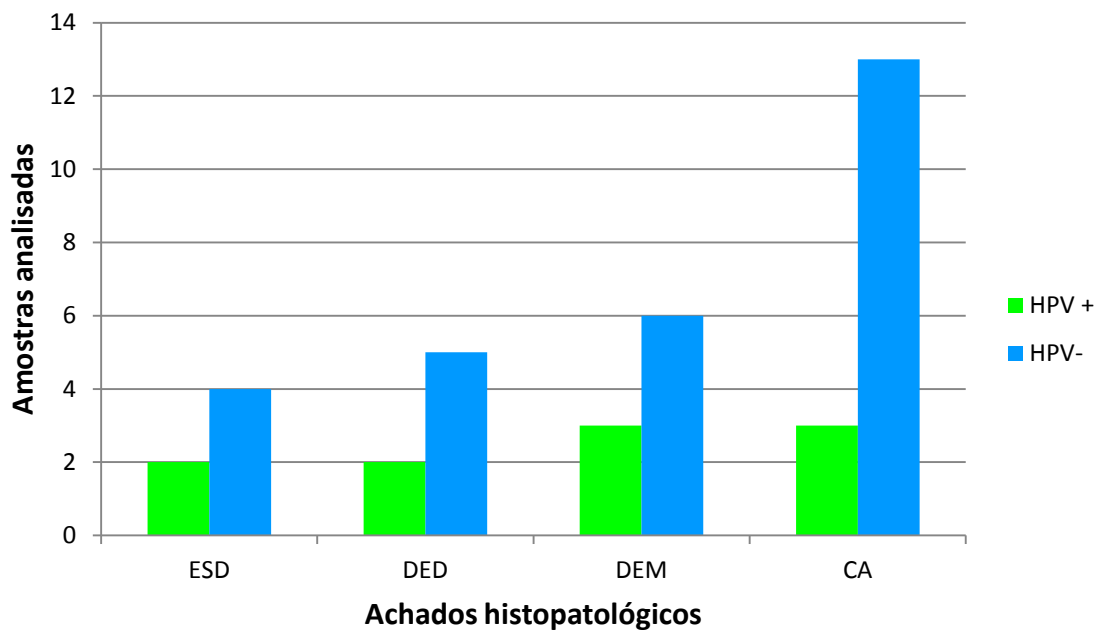
Tabela 3 – Frequência absoluta e porcentagem das amostras segundo os achados histopatológicos, Campo Grande, MS - 2022.

Achados histopatológicos	N	%
ESD	6	15,38
DED	7	17,95
DEM	9	23,08
CA	17	43,59
Total	39	100.0

Nota: ESD: Epitélio Sem Displasia; DED: Displasia Epitelial Discreta; DEM: Displasia Epitelial Moderada; CA: Carcinoma  $p>0,05$ . (Não houve significância estatística)

Na figura 6 podemos observar a associação da positividade para HPV DNA por *Nested* PCR entre as amostras estudadas ( $p>0,05$ ).

Figura 6 - Frequência de positividade para HPV DNA entre as amostras estudadas, segundo os achados histopatológicos. Campo Grande, MS - 2022.



Nota: ESD: Epitélio Sem Displasia; DED: Displasia Epitelial Discreta; DEM: Displasia Epitelial Moderada; CA: Carcinoma. HPV+: positivo para DNA de HPV; HPV-: Negativo para DNA de HPV.  $p>0,05$ . (Não houve significância estatística)

### 8.3 Análise Imunohistoquímica

A análise da expressão de CD163 e CD57 foi realizada em 39 amostras. A tabela 4 mostra a presença dos marcadores CD163 e CD57 segundo o tipo de lesão, entre as amostras estudadas ( $p>0,05$ ).

A média de células por  $\text{mm}^3$  expressando CD163 em amostras de pacientes negativos para HPV foi de 3990,31, e para pacientes positivos para o DNA de HPV foi de 3561,27 células por  $\text{mm}^3$ . Para CD57 a média de células por  $\text{mm}^3$  de pacientes negativos para HPV foi de 3091,40 enquanto para pacientes positivos para o DNA de HPV foi de 3162,52  $\text{mm}^3$  ( $p>0,05$ ).

Tabela 4 - Presença dos marcadores CD163 e CD57 segundo o tipo de achado histopatológico, entre as amostras estudadas, Campo Grande, MS- 2022.

Achados histopatológicos	CD163		CD57	
	N	Média (cels/ $\text{mm}^3$ )	N	Média (cels/ $\text{mm}^3$ )
ESD	7	3.053,83	7	3.007,43
DED	7	3.733,91	6	3.364,42
DEM	8	3.507,51	8	3.793,50
CA	17	4.456,32	17	2.741,05
Total	39	3.880,30	38*	3.110,12

Nota: ESD: Epitélio Sem Displasia; DED: Displasia Epitelial Discreta; DEM: Displasia Epitelial Moderada; CA: Carcinoma. N: número de amostras.  $\text{cels}/\text{mm}^3$ : Células por  $\text{mm}^3$ .  $p>0,05$ . (Não houve significância estatística)

\*A amostra L2 foi excluída da análise estatística do marcador CD57 pois não obteve nenhuma marcação

Na tabela 5 observamos os pacientes positivos para DNA de HPV segundo a classificação histopatológica e a média de células por mm<sup>3</sup> para a expressão de CD163 e CD57.

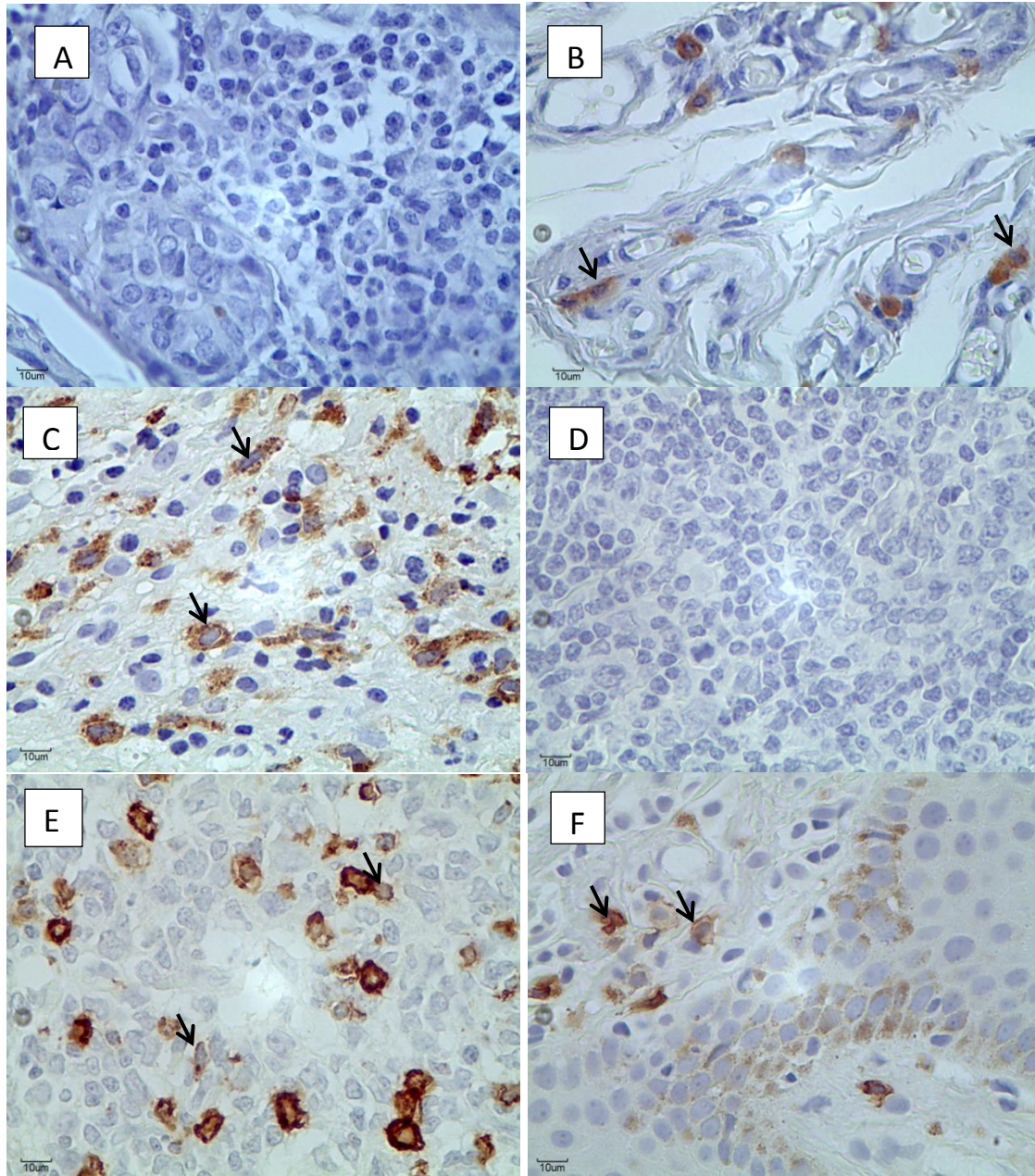
Tabela 5- Pacientes positivos para DNA de HPV segundo a classificação histopatológica e a média de células por mm<sup>3</sup> para a expressão de CD163 e CD57.

<b>Amostra DNA HPV +</b>	<b>Lesão</b>	<b>CD163*</b>	<b>CD57*</b>
3	CA	682,049	256,339
4	DED	270,069	494,372
5	DEM	260,915	260,917
6	DEM	407,397	1.121,49
12	DEM	434,862	205,965
13	ESD	292,957	228,373
25	CA	279,225	201,408
28	ESD	91,546	123,590
50	DED	526,413	119,013
54	CA	315,846	151,055
<b>MEDIA TOTAL</b>		<b>356,127</b>	<b>316,252</b>

Nota: ESD: Epitélio Sem Displasia; DED: Displasia Epitelial Discreta; DEM: Displasia Epitelial Moderada; CA: Carcinoma. \* média de células/mm<sup>3</sup>. p>0,05.(Não houve significância estatística)

Na figura 7 observa-se a expressão de CD163 e CD57 em tonsilas humanas e em biopsia da cavidade oral.

Figura 7- Expressão de CD163 e CD57 por imunohistoquímica em tonsila humana e biópsia da cavidade oral de pacientes atendidos na FAODO-UFMS e CEO, Campo Grande – 2022.



**A:** Controle negativo de tonsila humana para marcador CD163 400x; **B** Controle positivo tonsila humana marcada com anticorpos anti-CD163 400x; **C:** Biópsia da cavidade oral com células CD163<sup>+</sup> 400x; (Classificação histopatológica: CA) **D:** Controle negativo de tonsila humana para marcador CD57 400x **E:** Controle positivo tonsila humana marcada com anticorpos anti-CD57 400x **F:** Biópsia da cavidade oral com células CD57<sup>+</sup> 400x. (Classificação histopatológica: DEM). Cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (EasyPath, São Paulo, SP, Brasil)

## 9. Discussão

Este trabalho envolvendo a expressão de CD163 e CD57 e detecção de DNA de HPV em lesões da cavidade oral é inédito. Os principais resultados obtidos foram a observação em amostras de Carcinoma Epidermoide Oral de maior expressão de CD163, presentes predominantemente em macrófagos M2 e menor expressão de CD57, presentes também em células com características morfológicas de NK.

Alguns trabalhos trazem a necessidade de estudos sobre a presença de HPV na cavidade oral, sua relação com lesões, possível relação com o câncer e a necessidade da descoberta de novos marcadores imunológicos (BETZ, 2019; EL MOUSSAOUI et al., 2021; ELAHI; RAKHSHAN, 2020). Malerova et al.(2020) encontraram que 8,8% (19/215) dos pacientes envolvidos no estudo foram positivos para o DNA de HPV na cavidade oral. Morán-Torres et al.(2021) encontraram que 29,78% dos pacientes apresentavam DNA de HPV unicamente na cavidade oral. Enquanto que Antonsson et al.(2021) encontraram 10,7% (68/636) de pacientes positivos para o DNA de HPV na cavidade oral.

Em nosso estudo a positividade de DNA de HPV em amostras obtidas por esfoliação das lesões orais e de toda a mucosa oral assintomática foi de 27,78%, utilizando-se da técnica de *Nested* PCR e com os *primers* PGMY09/11 e GP5+/6+. Devemos considerar que nosso estudo foi realizado em pacientes que buscavam o atendimento em clínicas odontológicas por apresentarem lesões orais, portanto uma maior frequência de DNA para HPV foi esperada em relação aos estudos com mucosa oral normal.

Antonsson et al., (2021) investigaram as principais características de comportamento associadas à infecção oral por HPV como tabaco, sexo oral, consumo de álcool e número de parceiras sexuais. Estes autores não encontraram associação significativa entre estas características e o risco de infecção. No presente estudo também não foi verificada a associação entre as principais características epidemiológicas e o risco de infecção, talvez devido ao número limitado de participantes.

Em estudo desenvolvido no hospital universitário de Kobe no Japão, 34,6% (9/26) pacientes foram diagnosticados com carcinoma oral (SHIGEOKA et al., 2020).

Estudo realizado no período de 2010 a 2015 em hospitais de atendimento a pacientes com câncer no estado de São Paulo mostrou que 44,6% deles foram diagnosticados com carcinoma na cavidade oral (LOUREDO et al., 2022). No presente estudo, 43,59% dos pacientes foram classificados com carcinoma, corroborando com o estudo de Louredo et al., (2022), e considerando que os participantes do estudo foram pacientes que buscaram o atendimento ambulatorial de doenças orais.

De acordo com Nielsen et al. (2021) 70% dos casos de carcinoma de células escamosas da América do Norte e 73% dos casos na Europa estão relacionados ao HPV. Na Índia, a incidência de carcinoma em pacientes HPV positivos é de 46% (CHAKROBARTY et al., 2014), já no Reino Unido a prevalência foi de 2% (LOPES et al., 2011) enquanto que nos Estados Unidos foi de 5,9% (LINGEN et al., 2013).

Purwanto et al. (2020) encontraram 17,9% de positividade para HPV na mucosa oral em indivíduos com carcinoma escamoso oral. Nalli et al., (2022), em um estudo com pacientes com lesões orais, a prevalência de HPV na cavidade oral foi de 56% sendo que 13% foram classificados como carcinoma. No presente trabalho, 7,69% das amostras dos pacientes classificadas como carcinoma foram positivas para DNA de HPV. O método de esfoliação foi o escolhido para coleta de células na cavidade oral, sendo assim, temos que considerar que há uma menor quantidade de células que desprendem do epitélio da cavidade oral e em especial de lesões ceratosas, influenciando, dessa forma, na quantidade de DNA viral obtida para a análise.

Hadler-Olsen e Wirsing (2019) em uma revisão de literatura avaliando o valor prognóstico de células imunes infiltradas em tecidos de Carcinoma de Células Escamosas Orais (CCEO), por análise de sobrevivência juntamente com uma meta análise, encontraram que os macrófagos M2 CD163+ e as células NK CD57+ foram considerados os biomarcadores com melhor potencial prognóstico.

No presente estudo, foi observado o predomínio de células expressando CD163 nas amostras com carcinoma, seguida daquelas classificadas como DED. Nosso estudo corrobora com os achados de Shigeoka et al. (2020), onde as células CD163+ foram mais frequentes no grupo classificado como CCEO, na região dos ninhos tumorais mais do que nos locais de não lesão e epitélio normal.

No estudo de Chaudhari et al. (2020) foi encontrada uma correlação positiva entre o aumento dos TAMs CD163+ em pacientes com score de tumor-nódulo-metástase(TNM) superior. Estes mesmos autores demonstraram um número maior de TAMs CD163+ nas amostras CCEO classificadas histologicamente como pouco diferenciadas.

Os macrófagos M2 expressam altos níveis de IL-4, IL-10, fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TGF $\beta$ ), fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) e metaloproteinase de matriz, promovendo a progressão e metástase do tumor, além de reduzir resistência ao tratamento (EVRARD et al., 2019). Fujii et al., (2012) mostraram que nos pacientes com altos níveis de M2, a taxa de sobrevida foi menor, onde acreditam que os M2 podem ser mais ativos sob influência de fibroblastos associados ao câncer, aumentando a produção de M2, a invasão do câncer e resistência à terapia.

Maior quantidade de células T CD57+ predizem uma melhor resposta e quimioterapia e metástase reduzida. Isso pode ocorrer devido à expressão diminuída de moléculas do MHC de classe I em alguns tumores impedindo a imunovigilância dos linfócitos T Citotóxicos e tornando o papel das células NK essencial, desempenhando um importante papel na imunidade antitumoral (ELAHI; RAKHSHAN, 2020).

Em nosso estudo houve um predomínio de células expressando CD57 em amostras de pacientes classificadas como DEM seguida daquelas classificadas como DED. Também observamos uma menor expressão de CD57 nas amostras com CA Corroborando ao trabalho de Aló et al. (2021) onde as células NK CD57+ tiveram uma correlação negativa com CCEO.

A presença de células CD57+ com maior frequência em amostras classificadas DEM e DED e menor em CA demonstra a relevância da participação deste tipo celular nos processos iniciais da alteração displásica do epitélio e possível início da infecção por HPV. Com o estabelecimento da neoplasia e surgimento de mecanismos de supressão da resposta imune por parte de TAMs ou pelo próprio HPV, há um decréscimo da participação das células NK.

Embora não tenhamos encontrado associação entre a presença dos marcadores CD163 e CD57 com as diferentes classes histológicas e a presença do DNA de HPV, acreditamos que estes biomarcadores podem vir a ser utilizados para prognóstico do CEO, necessitando assim de maiores estudos para a confirmação.

## 10. Conclusão

Com base em nossos resultados concluímos que:

- Entre os participantes do estudo a positividade para DNA de HPV foi de 27,78%
- A expressão de CD163 (macrófagos M2) foi maior em amostras classificadas histologicamente como carcinoma
- A expressão de CD57 (células com características morfológicas de NK) foi menor em amostras classificadas histologicamente como carcinoma.
- Não houve relação entre a positividade para DNA de HPV e a expressão de CD163 e CD57 ( $p > 0,05$ ).
- A maioria dos participantes do estudo foram positivos para carcinoma.
- Não houve relação entre a positividade para DNA de HPV e os resultados histopatológicos. ( $p > 0,05$ )

## 11. Limitações do estudo

Como o estudo foi realizado com um conjunto de amostras já coletadas em projeto anterior, não foi possível a expansão do número de participantes e com isso um maior número de amostras analisadas



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 9ª edição ed. Rio de Janeiro: GEN Guanabara Koogan, 2019.
- AHN, J. et al. Prophylactic immunization with human papillomavirus vaccines induces oral immunity in mice. **The Laryngoscope**, v. 128, n. 1, p. E16–E20, 2018.
- ALÓ, P. L. et al. Immunohistochemical Differences in Squamous Precancerous and Cancerous Lesions of the Oral Cavity and the Larynx: Preliminary Data. **Applied Sciences**, v. 11, n. 5, p. 2048, jan. 2021.
- ANDRADE, J. O. M.; SANTOS, C. A. DE S. T.; OLIVEIRA, M. C. Fatores associados ao câncer de boca: um estudo de caso-controle em uma população do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 4, p. 894–905, dez. 2015.
- ANTONSSON, A. et al. Natural history of oral HPV infection: Longitudinal analyses in prospective cohorts from Australia. **International Journal of Cancer**, v. 148, n. 8, p. 1964–1972, 15 abr. 2021.
- 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, 23 jan. 1991.
- BETZ, S. J. HPV-Related Papillary Lesions of the Oral Mucosa: A Review. **Head and Neck Pathology**, v. 13, n. 1, p. 80–90, mar. 2019.
- BIXOFIS, R. B. et al. Significance of p16 Positive Expression in Oropharyngeal Cancers. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 23, p. 10289–10292, 2015.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. **Calendário Nacional de Vacinação 2022 -Adolescentes — Português (Brasil)**. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/calendario-vacinal-2022/calendario-nacional-de-vacinacao-2022-adolescentes/view>>. Acesso em: 29 dez. 2022.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. S. DE V. EM SAÚDE; D. DE V. DE D. T. C. G. DO P. N. DE I. **Informe técnico sobre a vacina Papilomavírus humano (HPV) na atenção básica**. Disponível em: <[https://saude.es.gov.br/Media/sesa/PEI/Informe\\_Tecnico\\_vacina\\_papilomavirus\\_humano\\_6\\_11\\_16\\_18\\_recombinante\\_agosto\\_2015.pdf](https://saude.es.gov.br/Media/sesa/PEI/Informe_Tecnico_vacina_papilomavirus_humano_6_11_16_18_recombinante_agosto_2015.pdf)>. Acesso em: 29 dez. 2022.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. S. DE V. EM SAÚDE; D. DE V. DE D. T. C. G. DO P. N. DE I. **nota-informativa N° 154, de 2017/CGPNI/DEVIT/SVS/MS**. Disponível em: <<https://sbim.org.br/images/files/nota-informativa-154-ms.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2022.
- BRENTJENS, M. H. et al. Human papillomavirus: a review. **Dermatologic Clinics**, v. 20, n. 2, p. 315–331, abr. 2002.
- CANDOTTO, V. et al. HPV infection in the oral cavity: epidemiology, clinical manifestations and relationship with oral cancer. **Oral & Implantology**, v. 10, n. 3, p. 209–220, 30 nov. 2017.
- CHAKROBARTY, B. et al. Relationship among tobacco habits, human papilloma virus (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.
- CHAUDHARI, N. et al. Evaluation of density of tumor-associated macrophages using CD163 in histological grades of oral squamous cell carcinoma, an immunohistochemical study. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 24, n. 3, p. 577, 2020.
- CHEN, X.-J. et al. Clinical Significance of CD163+ and CD68+ Tumor-associated Macrophages in High-risk HPV-related Cervical Cancer. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 18, p. 3868–3875, 17 out. 2017.

- CORRENTI, M.; RIVERA, H.; CAVAZZA, M. E. Detection of human papillomaviruses of high oncogenic potential in oral squamous cell carcinoma in a Venezuelan population. **Oral Diseases**, v. 10, n. 3, p. 163–166, maio 2004.
- DE RUITER, E. J. et al. Assessing the prognostic value of tumor-infiltrating CD57+ cells in advanced stage head and neck cancer using QuPath digital image analysis. **Virchows Archiv: An International Journal of Pathology**, v. 481, n. 2, p. 223–231, ago. 2022.
- DE VILLIERS, E.-M. et al. Classification of papillomaviruses. **Virology**, v. 324, n. 1, p. 17–27, 20 jun. 2004.
- DE VILLIERS, E.-M. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. **Virology**, Special Issue: The Papillomavirus Episteme. v. 445, n. 1, p. 2–10, 1 out. 2013.
- DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, Supplement: Human Papillomaviruses. v. 32, p. 7–15, 1 mar. 2005.
- EL MOUSSAOUI, S. et al. HPV Lesions and Other Issues in the Oral Cavity Treatment and Removal without Pain. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 20, p. 11158, 16 out. 2021.
- ELAHI, M.; RAKHSHAN, V. MED15, transforming growth factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1), Fc $\gamma$ RIII (CD16), and HNK-1 (CD57) are prognostic biomarkers of oral squamous cell carcinoma. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 8475, 21 maio 2020.
- EVRARD, D. et al. Macrophages in the microenvironment of head and neck cancer: potential targets for cancer therapy. **Oral Oncology**, v. 88, p. 29–38, jan. 2019.
- EZE, N.; LO, Y.-C.; BURTNESS, B. Biomarker driven treatment of head and neck squamous cell cancer. **Cancers of the Head & Neck**, v. 2, p. 6, 29 ago. 2017.
- FANEYE, A. O. et al. Oral human papilloma virus infection among dental clinic attendees in Ibadan, Nigeria. **African Journal of Laboratory Medicine**, v. 11, n. 1, p. 1555, 25 nov. 2022.
- FUJII, N. et al. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 41, n. 6, p. 444–451, jul. 2012.
- FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL. **Plano de Gerenciamento de Resíduos Sólidos**. , 2019. Disponível em: <<https://proadi.ufms.br/files/2020/05/2019-PLANO-DE-GERENCIAMENTO-DE-RES%3%8DDUOS-S%3%93LIDOS-vers%C3%A3o-preliminar.pdf>>. Acesso em: 25 jan. 2023
- GAMA, A. R. et al. HPV detection in oral mucosa samples in pediatric patients. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, 12 fev. 2021.
- GENDEN, E. M. et al. Human papillomavirus and oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 270, n. 2, p. 405–416, fev. 2013.
- GILLISON, M. L. et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. **JAMA**, v. 307, n. 7, p. 693–703, 15 fev. 2012.
- GISSI, D. B. et al. Podoplanin expression as a predictive marker of dysplasia in oral leukoplakia. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery: Official Publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 46, n. 5, p. 759–764, maio 2018.
- GISSMANN, L.; HAUSEN, H. Z. Human papilloma virus DNA: physical mapping and genetic heterogeneity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 4, p. 1310–1313, abr. 1976.

GOLDSCHMIDT, H.; KLIGMAN, A. M. Experimental Inoculation of Humans with Ectodermotropic Viruses<sup>11</sup> From the Department of Dermatology (Donald M. Pillsbury, M.D., Director), University of Pennsylvania School of Medicine, Philadelphia, Pennsylvania. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 31, n. 3, p. 175–182, set. 1958.

GOODMAN, J. VERRUCAE: A REVIEW. **Archives of Dermatology and Syphilology**, v. 30, n. 5, p. 659, 1 nov. 1934.

GRAVITT, P. E. et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 1, p. 357–361, jan. 2000.

HADLER-OLSEN, E.; WIRSING, A. M. Tissue-infiltrating immune cells as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 120, n. 7, p. 714–727, 2 abr. 2019.

HASAN, U. A. et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 178, n. 5, p. 3186–3197, 1 mar. 2007.

HAUSEN, H. Z. et al. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. **International Journal of Cancer**, v. 13, n. 5, p. 650–656, 15 maio 1974.

HERRERO, R. 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**, v. 8, n. 7, p. e68329, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER - INCA. **Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil**. [s.l.] INCA, 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER -INCA. **Detecção precoce do câncer**. [s.l.] INCA, 2021.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (ED.). **Human papillomaviruses: this publication represents the views and expert opinions of an IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, which met in Lyon, 15 - 22 February 2005**. Lyon: IARC, 2007.

JADASSOHN, J. Die benignen Epitheliome. **Die benignen Epitheliome**, p. 14, 1913.

KANODIA, S.; FAHEY, L. M.; KAST, W. M. Mechanisms used by human papillomaviruses to escape the host immune response. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, n. 1, p. 79–89, fev. 2007.

KIDD, J. G. THE COURSE OF VIRUS-INDUCED RABBIT PAPILLOMAS AS DETERMINED BY VIRUS, CELLS, AND HOST. **Journal of Experimental Medicine**, v. 67, n. 4, p. 551–574, 1 abr. 1938.

LINGEN, M. W. et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**, v. 49, n. 1, p. 1–8, jan. 2013.

LOPES, V. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity rarely harbours oncogenic human papillomavirus. **Oral Oncology**, v. 47, n. 8, p. 698–701, ago. 2011.

LOUREDO, B. V. R. et al. Epidemiology and survival outcomes of lip, oral cavity, and oropharyngeal squamous cell carcinoma in a southeast Brazilian population. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 27, n. 3, p. e274–e284, maio 2022.

MACHADO, A. P. et al. Presence of highly oncogenic human papillomavirus in the oral mucosa of asymptomatic men. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, p. 266–270, jun. 2014.

MALEROVA, S. et al. Prevalence and Risk Factors for Oral HPV in Healthy Population, in Central Europe. **Anticancer Research**, v. 40, n. 3, p. 1597–1604, mar. 2020.

- MIGALDI, M. et al. Low prevalence of human papillomavirus infection in the healthy oral mucosa of a Northern Italian population. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 41, n. 1, p. 16–20, jan. 2012.
- MORÁN-TORRES, A. et al. HPV oral and oropharynx infection dynamics in young population. **Brazilian Journal of Microbiology: [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, v. 52, n. 4, p. 1991–2000, dez. 2021.
- NALLI, G. et al. Detection of Oral Human Papillomavirus (HPV) and its Clinical Importance. **Journal of Dentistry (Shiraz, Iran)**, v. 23, n. 1, p. 51–57, mar. 2022.
- NASCIMENTO, A. C. DA S. et al. Oncogenic high-risk human papillomavirus in patients with full denture. **Brazilian Oral Research**, v. 33, 25 nov. 2019.
- NIELSEN, K. J. et al. The Effect of Prophylactic HPV Vaccines on Oral and Oropharyngeal HPV Infection—A Systematic Review. **Viruses**, v. 13, n. 7, p. 1339, jul. 2021.
- NOBRE, R. J. et al. Characterization of common and rare human papillomaviruses in Portuguese women by the polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism and sequencing. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 6, p. 1024–1032, maio 2010.
- ORIEL, J. D. Natural history of genital warts. **Sexually Transmitted Infections**, v. 47, n. 1, p. 1–13, 1 fev. 1971.
- PARKER, K. H. et al. HPV-specific antibodies at the oral cavity up to 30 months after the start of vaccination with the quadrivalent HPV vaccine among mid-adult aged men. **Vaccine**, v. 37, n. 21, p. 2864–2869, 9 maio 2019.
- PINTO, A. C. et al. Malignant transformation rate of oral leukoplakia-systematic review. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 129, n. 6, p. 600- 611.e2, jun. 2020.
- PINTO, L. A. et al. Quadrivalent Human Papillomavirus (HPV) Vaccine Induces HPV-Specific Antibodies in the Oral Cavity: Results From the Mid-Adult Male Vaccine Trial. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 8, p. 1276–1283, 15 out. 2016.
- PURWANTO, D. J. et al. The prevalence of oral high-risk HPV infection in Indonesian oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Diseases**, v. 26, n. 1, p. 72–80, jan. 2020.
- QU, W. et al. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 6, p. 1304–1310, jun. 1997.
- RAGIN, C. et al. Oral HPV Infection and Sexuality: A Cross-Sectional Study in Women. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 6, p. 3928–3940, 10 jun. 2011.
- RAUTAVA, J.; SYRJÄNEN, S. Human papillomavirus infections in the oral mucosa. **Journal of the American Dental Association (1939)**, v. 142, n. 8, p. 905–914, ago. 2011.
- RODRIGUES, T. L. C. et al. Leucoplasias bucais: relação clínico-histopatológica. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 14, p. 357–361, dez. 2000.
- SANCLEMENTE, G.; GILL, D. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 16, n. 3, p. 231–240, maio 2002.
- SATHISH, N.; WANG, X.; YUAN, Y. Human Papillomavirus (HPV)-associated Oral Cancers and Treatment Strategies. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 7\_suppl, p. 29S-36S, 1 jul. 2014.
- SCHEURER, M. E.; TORTOLERO-LUNA, G.; ADLER-STORTHZ, K. Human papillomavirus infection: biology, epidemiology, and prevention. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 15, n. 5, p. 727–746, set. 2005.

SHIGEOKA, M. et al. Intraepithelial CD163+ macrophages in tongue leukoplakia biopsy: A promising tool for cancer screening. **Oral Diseases**, v. 26, n. 3, p. 527–536, abr. 2020.

STRAUSS, M. J. et al. “Crystalline” Virus-Like Particles from Skin Papillomas Characterized by Intranuclear Inclusion Bodies. **Experimental Biology and Medicine**, v. 72, n. 1, p. 46–50, 1 out. 1949.

SUBBARAYAN, R. S. et al. The role of the innate and adaptive immune response in HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Laryngoscope Investigative Otolaryngology**, v. 4, n. 5, p. 508–512, 2019.

SUNDBERG, J. et al. Combined Testing of p16 Tumour-suppressor Protein and Human Papillomavirus in Patients With Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Anticancer Research**, v. 39, n. 3, p. 1293–1300, 1 mar. 2019.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

SWANGPHON, P. et al. Correlation of Circulating CD64+/CD163+ Monocyte Ratio and stroma/peritumoral CD163+ Monocyte Density with Human Papillomavirus Infected Cervical Lesion Severity. **Cancer Microenvironment**, v. 10, n. 1, p. 77–85, 1 dez. 2017.

TYRING, S. K. Human papillomavirus infections: Epidemiology, pathogenesis, and host immune response. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 43, n. 1, p. S18–S26, jul. 2000.

VILLA, L. L.; DENNY, L. CHAPTER 7 Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 94, p. S71–S80, nov. 2006.

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: a systematic review of observational studies. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 3, p. 155–166, 2016.

YIN, L. et al. HPV Population Profiling in Healthy Men by Next-Generation Deep Sequencing Coupled with HPV-QUEST. **Viruses**, v. 8, n. 2, p. 28, fev. 2016.

ZUR HAUSEN, H. Condylomata Acuminata and Human Genital Cancer. **Cancer Research**, v. 36, n. 2\_Part\_2, p. 794, 1 fev. 1976.

ZUR HAUSEN, H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 5, p. 342–350, maio 2002.

## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

### **Estudo: Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular.**

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado, com o objetivo de pesquisar a relação do vírus HPV com lesões de boca. Os dados fornecidos por você para este estudo, bem como os resultados de seus exames, serão pr e protegidos, sendo utilizados apenas para fins desta pesquisa, jamais associados a sua identidade. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você, ou seja, você continuará recebendo o atendimento odontológico que havia sido planejado.

**Eu, \_\_\_\_\_** (somente as iniciais), abaixo assinado (a) concordo de livre e espontânea vontade em participar do estudo intitulado: **Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular.** Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

1. O estudo se faz necessário para que se possa contribuir para o conhecimento da relação do HPV com o desenvolvimento de lesões em boca, melhorar o diagnóstico da infecção por Papilomavírus humano (HPV), bem como prevenir de forma mais eficaz o câncer de boca;
2. Após meu consentimento responderei a um questionário com perguntas fechadas e mistas, relacionadas a fatores sócio-comportamentais, necessárias ao estudo cuja resposta será mantida em sigilo.
3. Após meu consentimento será realizada uma coleta por esfoliação ou descamação com uma pequena escova, de lesões pré-estabelecidas da cavidade oral, sendo este método forma padrão de coleta para análise deste tipo de amostra, totalmente seguro, não invasivo, não oferecendo nenhum risco e com o mínimo de desconforto possível;
4. Após meu consentimento será realizada também uma coleta por biópsia, de lesões pré-estabelecidas da cavidade oral, por procedimento padrão necessário para diagnóstico e condutas de tratamento, mesmo em pacientes que são atendidos nas clínicas e que não fazem parte da pesquisa. O risco de desconforto existente, como dor ou edema, será minimizado ao máximo com

o uso de anestesia local e com a prescrição de analgésicos e anti-inflamatórios.

5. A participação neste projeto não me acarretará qualquer ônus pecuniário com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados, e estou ciente que não receberei nenhuma forma de pagamento pela minha participação neste estudo;

6. Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;

7. Estou ciente que ao final do projeto a amostra coletada por esfoliação será descartada de forma adequada, as lâminas e blocos utilizados para a análise histopatológica e imunohistoquímica serão devolvidas para o arquivo da Disciplina de Patologia Bucal da FAODO-UFMS.

8. A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;

9. Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo absoluto, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;

10. Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa;

11. Estou ciente que receberei uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE);

12. Caso tenha alguma dúvida ou reclamação posso entrar diretamente em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo telefone: 3345-7387.

**(OBS: Caso concorde em participar do estudo proposto, por favor rubricue a primeira página deste termo de consentimento livre e esclarecido)**

Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.

Paciente (Assinatura): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Pesquisadora Responsável  
Simone Bertozi de Souza Vasconcelos  
(67) 3345 7318

Campo Grande, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## APÊNDICE B – QUESTIONÁRIO SOCIOEPIDEMIOLÓGICO

**Projeto: Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular.**

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Código: \_\_\_\_\_

1. Idade: \_\_\_\_\_

2. Raça: (\_\_\_\_) Branca(\_\_\_\_) Preta (\_\_\_\_) Parda (\_\_\_\_) Amarela (\_\_\_\_) Indígena (Fonte: IBGE)

3. Estado civil?

(\_\_\_\_) solteiro(\_\_\_\_) casado/com companheira (\_\_\_\_) viúvo (\_\_\_\_) separado

4. Nível de Escolaridade

(\_\_\_\_) Analfabeto (\_\_\_\_) Fundamental (\_\_\_\_) Nível médio (\_\_\_\_) Ensino Superior (\_\_\_\_) Pós Graduação

5. Idade da primeira relação sexual: \_\_\_\_\_

6. Número de parceiros-(as) sexuais nos últimos dois anos: \_\_\_\_\_

7. Número aproximado de parceiros-(as) sexuais desde a primeira relação sexual: \_\_\_\_\_

8. Faz uso de preservativo (camisinha)?

(\_\_\_\_) Não (\_\_\_\_) Sim

9. Pratica sexo oral?

(\_\_\_\_) Não (\_\_\_\_) Sim

10. Faz uso de drogas?

(\_\_\_\_) Não (\_\_\_\_) Sim Qual: \_\_\_\_\_

11. Relato de Doença Sexualmente Transmissível (DST)

(\_\_\_\_) Não (\_\_\_\_) Sim Qual: \_\_\_\_\_

12. Faz uso do tabaco (cigarro, cachimbo, fumo)?

(\_\_\_\_) Não (\_\_\_\_) Sim

Há quanto tempo? (\_\_\_\_) 6 meses ou menos (\_\_\_\_) 1 a 2 anos (\_\_\_\_) 3 a 5 anos (\_\_\_\_) + de 5 anos



13. Ingestão de Álcool?

(\_\_\_\_) Não (\_\_\_\_) Sim

Com que frequência? (\_\_\_\_) diária(\_\_\_\_) 3 vezes por semana (\_\_\_\_) 2 ou menos vezes por semana

Qual a bebida? (\_\_\_\_) cerveja(\_\_\_\_) cachaças, destilados, uísque

14. Faz uso de algum remédio (medicamento) controlado?

(\_\_\_\_) Não (\_\_\_\_) Sim Qual:\_\_\_\_\_

15. Já apresentou alguma lesão na boca?

(\_\_\_\_) Não (\_\_\_\_) Sim Qual:\_\_\_\_\_

16. Se sim, para a pergunta anterior, realizou algum tratamento?

(\_\_\_\_) Não (\_\_\_\_) Sim Qual:\_\_\_\_\_

17. Usa prótese dentária?

(\_\_\_\_) Não (\_\_\_\_) Sim Qual tipo?:\_\_\_\_\_

## APÊNDICE C- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular(2).

**Pesquisador:** SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 87378918.7.0000.0021

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.621.049

#### Apresentação do Projeto:

A pesquisadora ressalta o contexto de que a leucoplasia é a lesão potencialmente neoplásica mais comum da cavidade oral, sendo considerada de maior risco para o desenvolvimento do câncer bucal. Entretanto, os fatores etiopatogênicos que determinam a sua transformação neoplásica permanecem obscuros. Apesar de existirem estudos a respeito do perfil de expressão de proteínas de proliferação (ki 67), diferenciação (citoqueratina 14 e 19) e ciclo celular (p16, p21) em leucoplasias e carcinoma epidermoide oral, há controvérsia se alterações nestes eventos celulares podem estar relacionadas a tipos oncogênicos de Papilomavírus humano (HPV). Os fatores de risco reconhecidos para o carcinoma de epidermoide, tais como o tabaco, o álcool, a radiação ultravioleta e a infecção pelo HPV, são fatores de risco também para a leucoplasia. Assim, o presente estudo descritivo observacional, de corte transversal, com amostragem do tipo não probabilístico por conveniência, analisará esfoliados de células da cavidade oral e biópsia de lesão oral de indivíduos afetados atendidos de julho de 2018 a julho de 2020, nas Clínicas da Faculdade de Odontologia (FAODO) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), campus de Campo Grande-MS, buscando investigar a correlação da infecção pelo HPV com os mecanismos de proliferação, diferenciação e ciclo celular que acarretam a transformação neoplásicas das leucoplasias,

**Endereço:** Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
**Bairro:** Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110  
**UF:** MS **Município:** CAMPO GRANDE  
**Telefone:** (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO  
MATO GROSSO DO SUL -  
UFMS



Continuação do Parecer: 2.621.049

**Critério de Inclusão:**

- Pacientes de ambos os sexos, acima de 18 anos de idade, e que apresentarem lesões em mucosa oral, classificadas clinicamente como leucoplasia e/ou carcinoma epidermoide oral (CEO), que estiverem de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

**Critério de Exclusão:**

- Pacientes menores de 18 anos de ambos os sexos, gestantes e pacientes que não apresentem lesões em mucosa oral, classificadas clinicamente como leucoplasia e/ou carcinoma epidermoide oral (CEO).

O tamanho estimado da amostra é de 125 indivíduos, sendo 25 indivíduos em cada um dos seguintes grupos: Epitélio com displasia moderada, Epitélio com displasia discreta, Carcinoma epidermoide, Epitélio sem displasia, Epitélio com displasia intensa.

**Objetivo da Pesquisa:**

"Correlacionar a presença do Papilomavírus humano (HPV) com marcadores de proliferação e diferenciação celular, em leucoplasia e carcinoma epidermoide orais."

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

- Riscos previstos pela pesquisadora: "Neste projeto será realizada uma coleta de células da cavidade oral por esfoliação ou descamação com uma pequena escova, sendo este método forma padrão de coleta para análise deste tipo de amostra, totalmente seguro, não invasivo, não oferecendo risco algum. Também será realizada uma coleta por biópsia, de lesões pré-estabelecidas da cavidade oral, por procedimento padrão necessário para diagnóstico e condutas de tratamento, mesmo pacientes que são atendidos nas clínicas e que não fazem parte da pesquisa deverão submeter-se a este procedimento para tratamento e diagnóstico, sempre por profissional odontólogo treinado." "O risco de desconforto, com o surgimento de dor e edema, durante a realização da biópsia será minimizado ao máximo com o uso de anestesia local e prescrição de analgésicos e anti-inflamatórios, se necessário."

- Benefícios previstos pela pesquisadora: "Os participantes da pesquisa terão como benefício o acompanhamento pós-cirúrgico da biópsia realizada, além do encaminhamento para tratamento na FAODO quando necessária à remoção cirúrgica de área maior ou acompanhamento para detecção de recidivas da lesão. Os participantes diretamente envolvidos no estudo serão

**Endereço:** Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
**Bairro:** Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110  
**UF:** MS **Município:** CAMPO GRANDE  
**Telefone:** (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 2.621.049

prontamente beneficiados, pois poderão usufruir, nas clínicas da FAODO, do estabelecimento de uma rotina de diagnóstico, tratamento e acompanhamento clínico mais adequado e bem direcionado ao tipo de lesão diagnosticada." "Poderão ser beneficiados também, pacientes acometidos pelas lesões em estudo, tanto a médio como em longo prazo, uma vez que marcadores prognósticos podem ser incorporados à rotina diagnóstica, auxiliando na definição de um prognóstico mais preciso e conseqüentemente na conduta terapêutica."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

- Vide itens abaixo.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

- Foram anexados: Projeto detalhado, modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, Declaração de uso de material biológico, Carta de Anuência do Diretor da FAODO, Carta de Anuência do Diretor do Instituto de Biotecnologia (autorizando a utilização das instalações e equipamentos dos Laboratórios de Imunologia e Histologia do Instituto para execução do Projeto), Termo de compromisso para utilização de informações de prontuário, Termo de compromisso para utilização de informações de bancos de dados, Instrumentos de coleta de dados, Cronograma e Orçamento da pesquisa.

**Recomendações:**

No final do TCLE, no campo para assinatura, trocar o termo "paciente" por participante.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Apresenta todos os itens necessários para aprovação do projeto de pesquisa.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1109179.pdf	09/04/2018 16:29:24		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOSimone.docx	09/04/2018 16:23:12	SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TLCE.docx	09/04/2018 16:21:46	SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS	Aceito

Endereço: Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
 Bairro: Caixa Postal 549 CEP: 79.070-110  
 UF: MS Município: CAMPO GRANDE  
 Telefone: (67)3345-7187 Fax: (67)3345-7187 E-mail: bioetica@propp.ufms.br



Continuação do Parecer: 2.621.049

Ausência	TLCE.docx	09/04/2018 16:21:46	SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	09/04/2018 16:20:30	SIMONE BERTOZI DE SOUZA VASCONCELOS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

CAMPO GRANDE, 25 de Abril de 2018

---

**Assinado por:**  
**Geraldo Vicente Martins**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Pró Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação/UFMS  
**Bairro:** Caixa Postal 549 **CEP:** 79.070-110  
**UF:** MS **Município:** CAMPO GRANDE  
**Telefone:** (67)3345-7187 **Fax:** (67)3345-7187 **E-mail:** bioetica@propp.ufms.br

**APÊNDICE D – DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE AMOSTRA**

Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

**DECLARAÇÃO**

Declaro, para os devidos fins, que autorizo a coleta de amostras da cavidade oral dos pacientes voluntários atendidos nas clínicas da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Faodo/UFMS), com a finalidade de participar do projeto de pesquisa **“Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular”**, que será desenvolvido pela pesquisadora **Professora Simone Bertozi de Souza Vasconcelos (INBIO/UFMS)**.

Campo Grande, 28 de setembro de 2017.

  
Paulo Zarate Pereira  
Diretor da Faodo

**APÊNDICE E- INFORME DE COLETA SESAU**

**PREFEITURA MUNICIPAL DE CAMPO GRANDE  
ESTADO DE MATO GROSSO DO SUL  
SECRETARIA MUNICIPAL DE SAÚDE**

C.I. N. 3.165/GEP/SESAU/2019, 13 de Fevereiro de 2019.

DE: Gerência de Educação Permanente - SESAU

PARA: Christiane Lima da Silva - Chefe de Divisão Odontológico

ASSUNTO: Autorização

Informo que o projeto de pesquisa da pesquisadora Simone Bertozi de Souza Vasconcelos, com o título do projeto Presença do Papilomavírus humano (HPV) em leucoplasia e carcinoma epidermoide de boca e sua relação com marcadores de proliferação e diferenciação celular.

Segue anexa a autorização do Comitê de Ética.

Informo que o pesquisador irá identificado para efetuar a coleta de informações, contato: 67 992839779 e e-mail: [simonebertozi@yahoo.com.br](mailto:simonebertozi@yahoo.com.br)

Atenciosamente,

José Alexandre dos Santos  
Assessor Executivo Iii