



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

UISEU

IDENTIFICAÇÃO DE SUBTIPOS DE HPV EM AMOSTRAS DA CLÍNICA DENTÁRIA UNIVERSITÁRIA

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:
Ana Francisca Neto da Silva

Viseu, 2024



CATÓLICA
FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA

VISEU

IDENTIFICAÇÃO DE SUBTIPOS DE HPV EM AMOSTRAS DA CLÍNICA DENTÁRIA UNIVERSITÁRIA

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Por:

Ana Francisca Neto da Silva

Orientador: Prof. Doutora Raquel Silva
Coorientador: Prof. Doutora Patrícia Couto

Viseu, 2024

Membros do Júri das Provas Públicas

Presidente: Rita Brandão de Pinho Noites, Professora Auxiliar

Arguente: Luís Filipe de Sepúlveda Silva Santos, Professor Auxiliar

Orientador: Raquel Monteiro Marques da Silva, Professora Auxiliar

Data das provas públicas: 12 / 09 / 2024

Validação e confirmação pelos serviços escolares:

___ / ___ / ___

*“Success is counted sweetest,
By those who ne’er succeed.
To comprehend a nectar
Requires sorest need.”*

- Emily Dickinson

À minha mãe, que mesmo longe, está sempre perto.
Sem ela nada era possível.

AGRADECIMENTOS

A conclusão desta dissertação representa o início de um novo capítulo. Mas não é possível virar a página, sem antes reconhecer o apoio e agradecer a todos os que me ajudaram a escrever estes últimos capítulos.

À minha Orientadora, Professora Doutora Raquel Silva, por todo o conhecimento e paciência que dedicou nos últimos anos a este projeto. Obrigada pela disponibilidade e apoio.

À minha Coorientadora, Professora Doutora Patrícia Couto, pela sua colaboração e atenção disponibilizada a este projeto.

Ao SalivaTec, em especial ao Ricardo por todo o trabalho dedicado, e a todos os que me ajudaram a tornar este projeto numa realidade.

À minha mãe, o meu maior exemplo, que desde pequenina me inspira a dar tudo de mim. Por todo o esforço, amor e carinho, por me permitir realizar os meus sonhos, e por me motivar a criar novos, obrigada.

Ao meu pai, por além de pai ser amigo. Obrigada por me encorajar e por toda a preocupação.

À minha avó, por acreditar sempre em mim. Por toda a companhia e por todos os risos.

Agradeço ao meu avô, pelo exemplo de uma vida como nenhuma outra e por todo o carinho. Espero que estejas orgulhoso, onde quer que estejas.

À minha melhor amiga Filipa Espingarda, por me ter ensinado o verdadeiro significado da amizade e por ser família.

Às que levo comigo, as minhas Marias, à Maria Garcia e à Francisca Marvão, obrigada por fazerem de Viseu casa.

À Marta, por me ter escolhido como madrinha e nunca mais me ter deixado ir.

E por fim, a Viseu, por me ter acolhido e ter feito sentir em casa, quando de casa estava longe.

Eternamente grata.

RESUMO

Introdução: O Vírus do Papiloma Humano (HPV) desempenha um papel importante no desenvolvimento do cancro, particularmente do cancro oral, como o carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço. Esta investigação teve como objetivo avaliar a prevalência de HPV e identificar os subtipos presentes em amostras de saliva dos pacientes da Clínica Dentária Universitária, de modo a contribuir para a identificação precoce de lesões malignas e potencialmente malignas na cavidade oral.

Materiais e métodos: Este trabalho consistiu num estudo observacional transversal. Foi desenvolvido um questionário com o objetivo de determinar os fatores de risco associados à infeção por HPV dos pacientes da Clínica Dentária Universitária. Uma amostra de conveniência composta por salivas de pacientes da Clínica Dentária Universitária, com idade superior a 18 anos, foi utilizada na validação do protocolo de genotipagem de HPV na saliva. A recolha das amostras foi feita em conformidade com os protocolos desenvolvidos no SalivaTec. A identificação de DNA viral nas amostras foi realizada por PCR.

Resultados: Foram analisadas 86 amostras de saliva, de pacientes entre os 21 e os 78 anos, de ambos os sexos. Os pacientes com carcinoma epidermóide queratinizante bem diferenciado e líquen plano reticular foram negativos para HPV. Nos pacientes saudáveis, duas amostras, foram positivas para a infeção por HPV, constituindo 2.3% de todas as amostras analisadas. Estas amostras foram negativas para os subtipos de HPV de alto risco 16 e 18. Os resultados da sequenciação foram inconclusivos para o subtipo de HPV presente nestas amostras.

Conclusão: A deteção da infeção pelo vírus do papiloma humano é essencial na identificação e diagnóstico precoce de lesões malignas e potencialmente malignas, possibilitando um melhor acompanhamento e tratamento de cancro associado à infeção por HPV. A utilização da saliva como meio diagnóstico e rastreio do HPV, apesar de apresentar várias vantagens, ainda não tem aplicação clínica devido à falta de consenso sobre os protocolos usados na colheita e análise das amostras.

Palavras-chave: Vírus do Papiloma Humano (HPV); Cancro Oral; Saliva; PCR

ABSTRACT

Introduction: The Human Papilloma Virus (HPV) plays an important role in the development of cancer, in particular oral and other head and neck cancers such as squamous cell carcinoma. The aim of this research was to assess the prevalence of HPV and to identify the different subtypes found in saliva samples from patients at the University Dental Clinic, in order to contribute to the identification of malignant and pre-malignant lesions in the oral cavity at an early stage.

Materials and Methods: This study consists of a cross-sectional observational study. A questionnaire was developed with the intention of determining the risk factors associated with HPV infection in patients at the University Dental Clinic. A convenience sample of saliva from patients of the University Dental Clinic, over the age of 18, was used to validate the HPV genotyping protocol in saliva. Samples were collected in accordance with the protocols developed at SalivaTec. PCR was used to identify viral DNA in the samples.

Results: A total of 86 saliva samples from patients between the ages of 21 and 78, of both genders, were analysed. Patients with well-differentiated keratinizing squamous cell carcinoma and reticular oral lichen planus were negative for HPV. In healthy patients, two samples were positive for the infection by HPV, making up 2.3% of all the samples tested. These samples were negative for the high-risk HPV subtypes 16 and 18. The sequencing results were inconclusive as to which HPV subtype was present in these samples.

Conclusion: The use of saliva as a means of diagnosis and screening for HPV, despite having several advantages, still lacks clinical application due to the lack of consensus on the protocols used to collect and analyse the samples.

The detection of human papilloma virus infection is essential for the identification and early diagnosis of malignant and pre-malignant lesions, resulting in better management and treatment of cancer associated with HPV infection. The use of saliva as a means of diagnosis and screening for HPV, despite its many advantages, still has no clinical application due to the lack of consensus on the protocols used to collect and analyse the samples.

Keywords: Human Papilloma Virus (HPV); Oral Cancer; Saliva; PCR

ABREVIATURAS

CAFs: Fibroblastos associados ao cancro

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

HIV: *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana)

HPV: *Human Papilloma Virus* (Vírus do Papiloma Humano)

JAK-STAT: *Janus kinase (JAK), Signal transducer and activator of transcription (STAT)*

LCR: *Long Control Region* (Região reguladora)

OMS: Organização Mundial de Saúde

PCR: *Polimerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)*

pRB: Proteína do Retinoblastoma

RNA: *Ribonucleic Acid* (ácido ribonucleico)

RNase: Ribonuclease

mRNA: RNA mensageiro

TME: *Tumor Microenvironment* (Microambiente Tumoral)

WHIM: *Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections, Myelokathexis* (Verrugas, Hipogamaglobulinémia, Infeções, Mielocatexia)

ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	IX
ABREVIATURAS	XI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO HPV E MEIOS DE TRANSMISSÃO.....	2
1.2 MECANISMOS INFECIOSOS.....	3
1.3 MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO.....	4
1.3.1 Reação em cadeia da Polimerase.....	4
1.3.2 Southern Blot.....	5
1.3.3 Hibridização “in situ”.....	6
1.4 FATORES DE RISCO.....	6
1.5 VACINAS PREVENTIVAS E VACINAS TERAPÊUTICAS.....	13
1.6 MANIFESTAÇÕES ORAIS.....	7
1.6.1 Papiloma Escamoso Oral.....	7
1.6.2 Hiperplasia Epitelial Focal.....	8
1.6.3 Condiloma.....	9
1.6.4 Líquen Plano Oral.....	9
1.6.5 Leucoplasia Oral.....	10
1.6.6 Carcinoma Oral.....	11
1.6.7 Síndrome de WHIM.....	12
1.7 TRATAMENTO.....	12
1.8 CANCRO ASSOCIADO À INFEÇÃO POR HPV.....	14
1.8.1 Cancro do Colo do Útero.....	15
1.8.2 Cancro da Cabeça e do Pescoço.....	16
1.9 OBJETIVOS.....	17
2 MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1 TIPO DE ESTUDO.....	19
2.2 RECOLHA DE DADOS.....	19
2.3 AMOSTRA.....	19
2.4 EXTRAÇÃO DE DNA.....	20
2.5 AMPLIFICAÇÃO POR PCR.....	20
2.6 VISUALIZAÇÃO.....	21
3 RESULTADOS	22
4 DISCUSSÃO	27
5 CONCLUSÃO	32
6 BIBLIOGRAFIA	33
7 APÊNDICES	39

1 INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o cancro continua a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo, tendo sido registadas cerca de 9.6 milhões de mortes em 2020 (1). As infeções virais contribuem significativamente para o desenvolvimento de cancro, sendo responsáveis por cerca de 15 a 20% de todos os casos (2). Vários vírus têm demonstrado desempenhar um papel importante na progressão de doenças cancerígenas sendo uma destas infeções, e a mais significativa, o Vírus do Papiloma Humano (HPV). O HPV é um vírus transmitido maioritariamente por via sexual, podendo estar presente na cavidade oral onde se manifesta originando vários tipos de lesões consoante os diferentes subtipos virais.

O vírus do papiloma humano é um dos grupos de vírus mais comuns a afetar as áreas cutâneas e mucosas. É um vírus não encapsulado, ou seja, não é envolto por uma membrana lipídica, e com uma cadeia dupla de DNA com 8000 pares de bases, pertencente à família *Papillomaviridae* (3,4).

Já foram identificados mais de 200 genótipos de HPV, divididos em 5 grupos (a, b, g, m e n), em que as lesões causadas variam de acordo com a sua especificidade para diferentes células humanas (5–7). Dentro do grupo a, existe um subgrupo com cerca de 15 subtipos de alto risco. Algumas das lesões causadas são leucoplasia oral, papiloma escamoso oral e carcinoma oral de células escamosas, associada aos subtipos de alto risco 16 e 18; a verruga vulgar oral associada aos subtipos 2 e 4; carcinoma verrucoso associado aos tipos 6, 11 e 16 (5,6).

O genoma do HPV divide-se em três regiões: a não codificante (LCR), onde estão presentes proteínas que visam a regulação da expressão dos genes virais e a replicação; a região precoce (E), com genes necessários para a codificação de proteínas promotoras da transcrição e replicação; e a região tardia (L), responsável pela codificação de proteínas estruturais (2,8).

A identificação de genótipos de HPV é conseguida através de uma análise de sequenciação do genoma, sendo depois categorizados por tipo, com base na

sequência do gene mais conservado que codifica a proteína L1, a principal proteína estrutural do capsídeo (9). Este gene difere apenas 10% entre os diferentes tipos de HPV (6,10). Além da L1, são codificadas mais sete proteínas no genoma viral. Seis são não-estruturais, E1, E2, E4-E7, e duas fazem parte da estrutura do capsídeo, L1 e L2. As proteínas E1, E2 e E4 são responsáveis pela replicação do DNA viral e a E1 pela transcrição, sendo que a proteína E2 regula a expressão oncogénica através da repressão das oncoproteínas E6 e E7. As variações nas sequências de bases do DNA que codificam as proteínas E6 e E7 distinguem os vários subtipos de HPV, consoante os fenótipos oncogénicos do vírus, em baixo, médio e alto risco (6,11). As vias de sinalização de fatores de crescimento estão a cargo da E5 (4,11).

O ciclo de vida do HPV tem como início a infeção da camada basal do epitélio pavimentoso estratificado, mantendo um baixo número de cópias do genoma viral. Após a diferenciação de células epiteliais, o vírus começa a sua replicação para um número mais elevado de cópias virais, expressando os genes do capsídeo L1 e L2, resultando na produção e libertação de novos viriões da superfície epitelial (11).

1.1 Epidemiologia do HPV e meios de transmissão

A infeção por HPV é das mais prevalentes a nível mundial, embora a prevalência do HPV na cavidade oral e orofaringe não esteja tão extensamente estudada como o HPV na zona cervical (6). No entanto, nos últimos anos, têm sido desenvolvidas novas técnicas de biologia molecular com o objetivo de aprofundar o conhecimento nesta área.

A prevalência da infeção varia consoante a população e a zona geográfica em estudo. De acordo com a literatura, existem dois picos de prevalência para a infeção por HPV em mulheres: o primeiro em mulheres jovens, com idade inferior a 25 anos, e o segundo em mulheres mais velhas. Em países em desenvolvimento, a prevalência de HPV é superior do que em países desenvolvidos (2). Contudo, é observável uma diferença significativa entre o sexo masculino e feminino. Nos Estados Unidos, entre 2009 e 2010, a prevalência de infeções orais por HPV de alto risco, como HPV16, foi de três a cinco vezes superior do que em mulheres (12).

Em indivíduos saudáveis, a prevalência de HPV oral é cerca de 4.5% a 7.5%, sendo que esta varia muito entre diferentes áreas geográficas, sendo a maioria dos dados publicados provenientes dos Estados Unidos (13,14).

Num estudo realizado em pacientes com cancro da orofaringe em Portugal, apesar da maioria destes pacientes ser do sexo masculino, os dados mostram que 63.64% dos tumores HPV positivos foram encontrados em pacientes do sexo feminino. Em contraste, apenas 14.63% pacientes masculinos apresentaram tumores positivos para HPV (15).

Apesar da frequência de infeções por HPV, o meio de transmissão para a cavidade oral ainda não se encontra totalmente esclarecido. Sabe-se, no entanto, que a transmissão deste vírus pode ocorrer de modo vertical, horizontal ou até mesmo por autoinoculação.

Na maioria dos casos, a transmissão ocorre de modo horizontal, através de relações sexuais com contacto entre a área oral e a zona anogenital (16). No entanto, já foi detetado HPV em indivíduos sem histórico de relações sexuais orais, mas que reportaram contacto boca a boca, demonstrando a hipótese de transmissão horizontal através de partilha de saliva (5,16).

No caso de transmissão vertical, esta pode ocorrer durante o parto quando a mãe apresenta infeção por HPV genital. Vários estudos reportaram a presença de papilomas orais em crianças cuja mãe apresentava HPV genital (5,16).

A autoinoculação surge pela coinfeção de HPV cervical e oral, sendo que este vírus se apresenta localmente e não de forma sistémica, podendo ter origem nas unhas infetadas de pessoas com HPV genital (16).

1.2 Mecanismos infecciosos

O Vírus do papiloma Humano infeta as células epiteliais basais da pele e da mucosa, onde ocorre a replicação viral, desencadeando uma infeção produtiva. A entrada do HPV nas células é facilitada pela interação das proteínas do capsídeo viral, principalmente a L1, com os recetores celulares presentes na camada basal. Uma vez dentro da célula hospedeira, o genoma viral é libertado e transportado para o núcleo, onde se inicia o processo de replicação e transcrição.

As oncoproteínas E6 e E7 desempenham um papel fundamental na proliferação da infecção por HPV e na subsequente carcinogénese. A proteína E6 tem como alvo a proteína p53, que intervém na regulação do ciclo celular e na reparação do DNA, degradando-a. Assim, é impedida a ativação de pontos de controlo do ciclo celular, permitindo a sobrevivência e proliferação de células infetadas. Já a proteína E7 liga-se à proteína do retinoblastoma pRB, inativando-a, o que conduz à desregulação do controlo do ciclo celular e consequentemente promovendo a proliferação celular (17).

1.3 Métodos de diagnóstico

O exame clínico da lesão, citologia e biópsia podem ser utilizados em caso de suspeitas de lesões de HPV na mucosa oral e orofaringe. O estudo histopatológico da lesão pode confirmar e definir o grau, no entanto, os testes de biologia molecular são os únicos capazes de detetar DNA de HPV na célula, sendo a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) a técnica com mais sensibilidade na identificação de HPV (5).

A infecção pelo HPV pode ser dividida em três tipos, latente, subclínica e clínica. As infeções latentes só podem ser diagnosticadas através de métodos de biologia molecular; as subclínicas não têm sintomas clínicos, mas apresentam alterações detetadas por métodos diagnósticos como biópsias; e as clínicas, onde são visíveis lesões significativas aquando do exame clínico (4).

1.3.1 Reação em cadeia da Polimerase

A técnica de PCR continua a ser a técnica mais utilizada na deteção e genotipagem do HPV. Baseia-se na amplificação de uma sequência de DNA, podendo chegar a 1 bilhão de cópias, tendo a capacidade de detetar quantidades mínimas de DNA do HPV (6).

Nesta técnica, uma sequência de DNA é amplificada através de vários ciclos de desnaturação a alta temperatura, ligação de *primers* oligonucleotídicos complementares à sequência alvo e replicação de DNA por uma polimerase de DNA termoestável a temperaturas moderadas (6).

Vários estudos utilizaram a técnica de PCR para detetar a presença de HPV em amostras orais, entre as quais saliva. Num estudo, foi analisada a exatidão diagnóstica da deteção do HPV em amostras salivares de pacientes com carcinoma das células escamosas da cabeça e pescoço associado a HPV, onde se concluiu que a amplificação por PCR de 37 subtipos diferentes de HPV mostrou resultados promissores para a deteção através de saliva (18).

1.3.2 Southern Blot

Southern Blot é uma técnica de biologia molecular usada na deteção de sequências específicas de DNA numa determinada amostra. Esta técnica consiste em várias etapas que levam à identificação e caracterização dos fragmentos de DNA em análise, começando pela extração do DNA da amostra (6).

Após a extração, são produzidos fragmentos de DNA por enzimas de restrição, que têm como função cortar a cadeia de DNA em locais específicos. Estes fragmentos são então separados por tamanho usando a eletroforese em gel, através da aplicação de um campo elétrico que causa a movimentação dos fragmentos de DNA na matriz de gel, sendo que os de menores dimensões se deslocam mais rapidamente e para uma maior distância (6).

Depois da eletroforese, faz-se a transferência dos fragmentos de DNA do gel para uma membrana de suporte sólido. Esta transferência, designada por “*blotting*”, é geralmente obtida por capilaridade. De forma a detetar as sequências específicas de DNA de interesse, a membrana é hibridizada com uma sonda, uma molécula de DNA de cadeia simples complementar à sequência pretendida, que se liga aos fragmentos alvo através do emparelhamento de bases complementares. Esta sonda é detetada, gerando um sinal que indica a presença e localização das sequências de DNA alvo na membrana(19).

A técnica de *Southern Blot* tem algumas limitações, no que toca à baixa sensibilidade em comparação com outros métodos, tais como o PCR, ao facto de ser uma técnica trabalhosa e de necessitar de grandes quantidades de DNA (20,21).

1.3.3 Hibridização “*in situ*”

A hibridização “*in situ*” é uma técnica importante para o diagnóstico e caracterização das infecções pelo vírus do papiloma humano. As sequências específicas de ácidos nucleótidos, tais como o DNA e o RNA do HPV, podem ser detetadas e localizadas em amostras de tecido (22).

Em relação ao HPV, esta técnica pode ser utilizada para identificar DNA ou RNA virais em células infectadas, facultando informações relevantes acerca da presença e atividade do vírus. Este método permite a detecção do mRNA das proteínas E6 e E7, o que indica a atividade viral nas células tumorais, permitindo a visualização da expressão do gene viral (22). Adicionalmente, pode também ser utilizada na detecção de genótipos ou subtipos de HPV, fornecendo assim informação sobre as variantes virais presentes na amostra tecidual (23).

Para além de um método diagnóstico, a hibridização “*in situ*” tem sido aplicada na investigação do papel do HPV na carcinogénese, através da visualização da integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro. Deste modo, é capaz de fornecer informações acerca das alterações genómicas e da desregulação celular associada à carcinogénese por HPV (24,25).

Através da combinação desta técnica com outras técnicas de biologia molecular e à análise histopatológica, é possível adquirir uma compreensão mais abrangente de doenças associadas à infeção por HPV, levando a melhores técnicas de diagnóstico, de tratamento e de prevenção.

1.4 Fatores de risco

Os fatores de risco para a infeção por HPV podem ser divididos em fatores biológicos ou comportamentais.

Os fatores de risco biológico englobam uma série de elementos que influenciam a infeção e persistência do vírus do papiloma humano, tais como a idade, a genética e a função imunitária do indivíduo (26,27). As interações moleculares entre os fatores virais e as respostas imunitárias do hospedeiro têm um papel importante na infeção por HPV, sendo que diferentes características das vias antivíricas do hospedeiro resultam em diferentes mecanismos de regulação da atividade do HPV como, por exemplo, o impedimento da

transcrição do HPV-31 através da indução das proteínas Sp100 (28). Já a presença de polimorfismos de nucleótido único específicos em genes como *TP53* e *MDM2* foi associada à infecção por HPV, o que indica uma predisposição genética para a suscetibilidade da infecção por este vírus (29). A correlação entre indivíduos com HIV e a infecção por HPV destaca o impacto imunológico que a imunossupressão do HIV tem na infecção de múltiplos subtipos de HPV de alto risco em doentes com funções imunitárias comprometidas (26–28,30).

Para além dos fatores biológicos, os fatores comportamentais desempenham um papel importante na transmissão e aquisição da infecção por HPV. Este conjunto de fatores são, na maioria das vezes, as causas mais associadas aos fatores de risco do HPV (31). Vários estudos identificaram uma grande variedade de comportamentos associados a um risco acrescido da infecção por HPV, incluindo hábitos sexuais de risco, como a idade do início da atividade sexual e o número de parceiros sexuais, hábitos alcoólicos e tabágicos, um estilo de vida sedentário e uma falta de equilíbrio alimentar (32,33).

1.5 Manifestações orais

1.5.1 Papiloma Escamoso Oral

O papiloma escamoso oral é um tumor benigno comum presente no epitélio oral. A sua prevalência não está bem documentada, no entanto julga-se que seja relativamente baixa (5,22).

Estas lesões apresentam-se como formações exofíticas, assemelhando-se a uma couve-flor, com cerca de 1 a 3mm de diâmetro. São geralmente encontradas nos lábios, mucosa oral e gengiva (34,35). O exame clínico e a análise histopatológica são necessários para o correto diagnóstico do papiloma escamoso oral. Histologicamente, são caracterizadas por um núcleo fibrovascular revestido por um epitélio benigno, com possíveis zonas de hiperplasia. As características histopatológicas destas lesões são semelhantes às de outras lesões inflamatórias, sendo que a comunicação entre clínicos e patologistas é crucial para um correto diagnóstico e tratamento. Apesar de ser

uma lesão geralmente benigna, já foram registados casos de transformação maligna, embora o risco seja baixo (34,35).

Os subtipos de HPV 1-4,6,7,10,11 e 13 já foram detetados em diversos tipos de lesões orais, incluindo o papiloma escamoso. No entanto, estas lesões também podem ocorrer como reação a uma agressão e não na forma de uma verdadeira neoplasia (36,37).

O tratamento destas lesões passa geralmente pela excisão cirúrgica, tendo um prognóstico bastante favorável, com baixa taxa de recidiva (5,35).

1.5.2 Hiperplasia Epitelial Focal

A hiperplasia epitelial focal, também designada por doença de Heck, é uma alteração benigna da mucosa, que se caracteriza pela proliferação do epitélio escamoso oral. Tem um perfil hereditário autossómico recessivo, podendo afetar indivíduos de qualquer idade e género (5,38).

A sua etiologia não é totalmente conhecida, mas acredita-se que esteja associada à infeção pelo vírus do papiloma humano, particularmente ao HPV-13 e HPV-32. As lesões apresentam-se normalmente como múltiplas pápulas ou nódulos, macias e indolores, podendo variar em tamanho e cor, e são encontradas frequentemente na mucosa bucal, da língua e dos lábios (38).

Histologicamente, é caracterizada por uma hiperplasia epitelial focal com acantose, paraqueratose e a presença de coilócitos, uma característica da infeção por HPV, células epiteliais escamosas com vacuolização perinuclear. A presença de antigénios do HPV nestas lesões pode ser confirmada através da coloração imunohistoquímica (38).

O diagnóstico da hiperplasia epitelial focal tem por base as observações clínicas. Não é necessário tratamento na maioria dos casos, a não ser por questões estéticas ou funcionais. Nestes casos, pode ser feita a excisão cirúrgica ou a ablação com laser (38).

1.5.3 Condiloma

O condiloma é uma lesão benigna comum associada a certos subtipos de HPV, maioritariamente HPV-6 e HPV-11. Caracteriza-se por pequenas protuberâncias, com forma de couve-flor, que surgem na zona oral, genital e anal (7). Na cavidade oral, o condiloma deve ser diferenciado de outras lesões associadas ao HPV, como o papiloma escamoso oral.

São transmitidos sobretudo através do contacto sexual, o que inclui sexo vaginal, anal e oral, sendo maior o risco de transmissão quando as verrugas são visíveis. O vírus tem a capacidade de entrar no organismo através de microabrasões na pele ou mucosa. No entanto, também é possível ocorrer na ausência de lesões visíveis, aquando da presença de infeções subclínicas ou latentes. Tem um período de incubação que varia desde 3 semanas a cerca de 8 meses, sendo que as manifestações clínicas podem demorar entre 2 a 3 meses. Estas lesões podem ser diagnosticadas através de exames clínicos visuais da zona genital, podendo ser realizada uma biópsia para confirmar a presença de infeção (7).

Existem várias opções de tratamento disponíveis, incluindo medicação tópica, crioterapia, excisão cirúrgica ou ablação com laser. No entanto, só é eliminada a lesão, e não o vírus, sendo possível uma reincidência (39).

1.5.4 Líquen Plano Oral

O líquen plano oral é uma doença inflamatória crónica da mucosa oral. A sua causa exata é atualmente desconhecida, mas crê-se que esteja relacionada com uma resposta imunitária desregulada, despoletada por fatores genéticos e ambientais. Esta doença está associada a uma série de fatores de risco, tais como stress, trauma, diabetes, hepatite C e a infeção por HPV. De acordo com a literatura, as lesões de líquen plano oral são duas vezes mais prováveis de apresentar DNA de HPV do que mucosa oral saudável. No entanto, estes dados são muito variáveis entre estudos e diferentes meios diagnósticos, sendo que a prevalência da infeção por HPV nestas lesões pode variar entre 2.7% e 70% (9,40–42).

A prevalência de líquen plano oral é de aproximadamente 2%, observando-se uma maior prevalência no sexo feminino. É caracterizado pela presença de lesões brancas, rendilhadas, reticulares ou erosivas na mucosa oral, podendo ser acompanhadas de sintomas como dor, ardor e alterações no paladar (40–43).

Pode ser classificado em dois grupos, atrófico-erosivo e não-atrófico-erosivo. Os tipos papular, reticular e em placa pertencem ao grupo não-atrófico-erosivo. Ao grupo atrófico-erosivo, pertencem os tipos erosivo, atrófico e bolhoso. Este último grupo apresenta ser mais suscetível a uma transformação maligna (42).

O líquen plano oral é diagnosticado através de exames clínicos e análises histopatológicas. Histologicamente, caracteriza-se por um infiltrado linfocítico no tecido conjuntivo subepitelial. A apresentação clínica e as características histológicas podem variar, tornando o diagnóstico e o diagnóstico diferencial um fator desafiante.

O tratamento tem como objetivo o alívio dos sintomas, o controlo da inflamação e a prevenção de futuras complicações. As opções de tratamento passam pela aplicação de corticosteróides tópicos, agentes imunomoduladores e medicação sistémica, sendo necessário um acompanhamento regular devido a um potencial de transformação maligna (40,43).

1.5.5 Leucoplasia Oral

A leucoplasia oral é um termo clínico utilizado para descrever uma mácula ou placa branca não removível e que não tem qualquer associação com outra patologia. Tem o risco potencial de evoluir para um carcinoma oral de células escamosas, sendo considerada uma lesão potencialmente maligna. A prevalência da leucoplasia oral é muito variável entre diferentes populações, indo de 0.2 a 5.2% consoante a população em estudo (44).

A etiologia da leucoplasia oral é multifatorial, incluindo alguns fatores de risco tais como o consumo tabágico e alcoólico, inflamação crónica, má higiene oral e predisposição genética. Um importante indicador de transformação maligna é a presença de displasia na lesão leucoplásica, referindo-se ao crescimento e maturação anormais de células. A sua gravidade pode ser

classificada como ligeira, moderada ou grave, com base no grau de alterações celulares observáveis aquando do exame histopatológico. Alguns estudos sugerem a existência de uma ligação entre o HPV e a leucoplasia oral, reportando a presença desta infeção em 20% dos casos, sendo que quanto maior for o risco de malignidade da lesão, maior será a prevalência de HPV. No entanto, ainda não se sabe qual o papel do HPV no desenvolvimento e progressão maligna das lesões de leucoplasia (45,46).

A abordagem terapêutica da leucoplasia envolve uma estratégia multidisciplinar, nomeadamente a eliminação de fatores de risco, uma atenta monitorização e a possibilidade de uma intervenção cirúrgica, sendo o principal objetivo a prevenção de transformação maligna. As opções de tratamento passam pela excisão cirúrgica, ablação por laser, a crioterapia e medicação tópica (45,47).

1.5.6 Carcinoma Oral

O carcinoma oral, mais especificamente o carcinoma oral de células escamosas, é uma neoplasia maligna com origem no epitélio oral. É o tipo mais comum de cancro da cavidade oral e representa um problema de saúde significativo a nível mundial. Está associado a vários fatores de risco tais como tabagismo, consumo de álcool, e infeção por HPV. Nos casos de carcinoma das células escamosas da orofaringe associado a HPV, o subtipo com maior prevalência é o HPV-16, estando presente em mais de 85% destas neoplasias (48–50).

É caracterizado como uma úlcera persistente que não cicatriza ou uma mancha vermelha ou branca na cavidade oral, podendo desenvolver-se na língua, no pavimento da boca, na gengiva, entre outros locais (48).

O prognóstico destes carcinomas está dependente de vários fatores, dos quais o estadio tumoral, a invasão perineural, a presença ou não de metástases nos gânglios linfáticos e o seu grau histológico. A deteção precoce é fundamental para um melhor prognóstico e sobrevivência de pacientes com carcinomas (51,52).

Como tratamento, estão disponíveis a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, dependendo do estadio e extensão da doença (48).

Existem múltiplas causas contribuintes para o desenvolvimento e progressão destas lesões, incluindo alterações genéticas, desregulação das vias de sinalização, inflamação crónica e interações com o microbioma oral (49).

1.5.7 Síndrome de WHIM

A síndrome de WHIM é uma deficiência imunitária congénita autossómica dominante, associada a uma disfunção de células imunitárias causada pela ativação do recetor de quimiocinas CXCR4, aumentando o risco de infeções bacterianas e uma maior suscetibilidade a lesões causadas pela infeção por HPV (53,54).

O acrónimo “WHIM” representa Verrugas, Hipogamaglobulinémia, Infeções e Mielocatexia. Os indivíduos com esta síndrome têm lesões verrucosas persistentes, sendo que muitos desenvolvem cancro anogenital associado à infeção por HPV. Foi ainda demonstrado que a ativação da sinalização CXCR4 nos queratinócitos epidérmicos é responsável por conferir capacidade de transformação a subtipos de HPV oncogénicos, o que leva a um aumento da replicação viral em pacientes com a síndrome de WHIM (6).

Adicionalmente, estes indivíduos partilham de uma série de características clínicas tais como neutropenia, linfopenia das células B e hipogamaglobulinémia, o que contribui para infeções recorrentes e aumenta a suscetibilidade de lesões induzidas por HPV (53,55).

1.6 Tratamento

A maioria das infeções por HPV na cabeça e pescoço são eliminadas em pessoas saudáveis, entre 6 a 20 meses após a infeção. No entanto, o HPV-16 é o subtipo que mais demora a eliminar, cuja infeção pode durar até 20 meses (16).

Nestes, caso a infeção persista, existem tratamentos disponíveis para a remoção das lesões, apesar de não haver cura para a infeção, visto que esta persiste no epitélio, podendo levar à recidiva da lesão. As opções de tratamento variam consoante a manifestação e gravidade da infeção (39).

Para as manifestações não malignas, a remoção destas lesões pode ser feita através de tratamentos clínicos como agentes cáusticos, provocando

destruição tecidual, métodos cirúrgicos, através da excisão cirúrgica da lesão com bisturi tradicional ou da ablação com laser, medicação tópica e terapia fotodinâmica. O objetivo destes tratamentos é a remoção ou destruição do tecido verrucoso e estimular o sistema imunológico para eliminar a infecção (39,56).

1.7 Vacinas preventivas e vacinas terapêuticas

A prevenção da infecção pelo vírus do papiloma humano pode ser feita através da vacinação profilática, eficaz entre 90 a 100% dos casos (12). No entanto, ainda não foi estudado o efeito das vacinas no HPV oral e subsequentes lesões. Apesar disso, há estudos que demonstram que indivíduos imunizados com a vacina possuem anticorpos salivares capazes de neutralizar pseudovírus, *in vitro*, reforçando a ideia de que as vacinas disponíveis são capazes de prevenir a infecção por HPV e consequente cancro da cabeça e pescoço (16). Estes pseudovírus são partículas que se assemelham ao vírus, mas que não contêm material genético viral, não sendo infecciosas (57).

Atualmente, existem três tipos principais de vacinas para a prevenção contra a infecção por HPV e doenças associadas, a bivalente (HPV-16/18), a quadrivalente (HPV-6/11/16/18) e a nonavalente (HPV-6/11/16/18/31/33/45/52/58). Estas vacinas demonstraram ser extremamente eficazes na prevenção de infecções por HPV e doenças como o cancro do colo do útero, entre outros, e verrugas genitais. A vacinação é recomendada tanto para indivíduos do sexo masculino como do sexo feminino, preferencialmente antes do início da atividade sexual, de modo a maximizar a eficácia da vacina antes da exposição ao vírus do papiloma humano (58).

Em Portugal, de acordo com a DGS, a vacina contra o HPV está incluída no Programa Nacional de Vacinação para crianças com idade igual ou superior a 9 anos e até aos 27 anos. Trata-se de uma vacina recombinante de proteínas L1 dos génotipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52, 58 (59).

Para além das vacinas preventivas, as vacinas terapêuticas contra o HPV visam tratar as infecções por HPV existentes e as doenças associadas, através da indução de uma resposta imunitária mediada por células contra os antígenos do HPV, especificamente as oncoproteínas E6 e E7. Estas vacinas mostraram-se promissoras em estudos pré-clínicos e clínicos, através da utilização de uma

variedade de abordagens, tais como vetores virais, proteínas, DNA e RNA, e vacinas celulares (58,60,61).

O objetivo destas vacinas passa pela geração de uma resposta imune contra as células infetadas por HPV, levando à regressão de lesões associadas a esta infeção. Estas vacinas têm como alvo a ativação de células T específicas para antígenos HPV, de modo a reconhecer e eliminar as células infetadas por HPV (62).

Embora as vacinas terapêuticas se tenham revelado promissoras em ensaios preliminares, ainda são precisos vários avanços para melhorar a sua eficácia e segurança, incluindo a resposta imunitária ao HPV e a diversidade de doenças associadas a esta infeção (60).

1.8 Cancro associado à infeção por HPV

A infeção persistente pelo vírus do papiloma humano é um fator de risco estabelecido para o desenvolvimento de vários tipos de cancro, incluindo o cancro do colo do útero e cancro da cabeça e do pescoço, entre outros. Embora a infeção pelo HPV seja necessária para a carcinogénese, por si só não é suficiente, sendo necessários outros fatores tais como a resposta imunitária do hospedeiro, fatores genéticos e ambientais para a progressão da infeção para cancro (63).

O microambiente tumoral (TME) também exerce um papel fundamental na carcinogénese induzida por HPV. Este é uma entidade dinâmica e interativa, que inclui fibroblastos associados ao cancro (CAFs), que tem a capacidade de desencadear a iniciação, progressão e metástase tumoral. As células do estroma no microambiente tumoral contribuem para o meio pro-inflamatório, a evasão imunitária, a proliferação e invasão associada aos cancros por HPV (63,64).

A interação entre o HPV e o sistema imunitário do hospedeiro é um aspeto essencial na carcinogénese induzida por HPV. Este vírus desenvolveu mecanismos para evitar a vigilância imunitária e conseguir estabelecer uma infeção persistente, sendo as oncoproteínas E6 e E7 fundamentais para a evasão imunitária através da interferência com a resposta imunitária do hospedeiro e da regulação negativa de proteínas supressoras tumorais, como a pRB e a p53. A resposta imunitária à infeção pelo vírus do papiloma humano

envolve elementos da resposta imunitária inata e adaptativa, sendo que o equilíbrio entre a resposta pro-inflamatória das citocinas produzidas pelas células Th1 e a resposta imunossupressora das citocinas produzidas pelas células Th2, influencia a progressão da doença e o desenvolvimento de cancro (65).

Adicionalmente, modificações epigenéticas também desempenham um papel na carcinogénese induzida pelo HPV, podendo levar a alterações na metilação do DNA, modificação das histonas e perfis de RNA não-codificante, o que pode afetar a expressão de genes virais e do hospedeiro, envolvidos no desenvolvimento tumoral. A integração do DNA do vírus no genoma do hospedeiro pode ainda perturbar a regulação epigenética e promover a instabilidade do genoma, estimulando assim a progressão para malignidade (36,65).

A investigação dos mecanismos moleculares que estão na base da carcinogénese induzida por HPV, nomeadamente a interação entre fatores virais e do hospedeiro, e as respostas imunitárias e modificações epigenéticas, é de grande importância para o desenvolvimento de novas e melhoradas estratégias de prevenção, métodos de deteção precoce e terapias específicas para cancros associados à infeção por este vírus.

1.8.1 Cancro do Colo do Útero

A infeção pelo HPV está intimamente relacionada com o desenvolvimento do cancro do colo do útero, sendo o HPV-16 o subtipo mais comum nos carcinomas de células escamosas do colo do útero, e o HPV-18 no adenocarcinoma do colo do útero (66).

A presença de HPV no colo do útero é detetada em cerca de 98.5% dos cancros invasivos do colo do útero, salientando a grave associação entre esta infeção e o desenvolvimento de cancro (66).

1.8.2 Cancro da Cabeça e do Pescoço

O cancro da cabeça e pescoço abrange um conjunto de neoplasias malignas com origem no revestimento mucoso do trato aerodigestivo superior, tais como a cavidade oral, nasofaringe, laringe e orofaringe.

Estes cancros variam histologicamente de indiferenciados não-queratinizados, para diferenciados e queratinizados. No entanto, cerca de 90% dos cancros da cabeça e pescoço são carcinomas de células escamosas (15,67). Os hábitos alcoólicos e tabágicos, bem como a infeção por HPV, são fatores de risco associados ao desenvolvimento de lesões cancerígenas. O tabagismo é o fator de risco mais reconhecido para o desenvolvimento de cancro, devido à exposição a carcinogéneos presentes no tabaco, que provocam displasia celular (44). O consumo de álcool, apesar dos seus mecanismos de carcinogénese não serem totalmente compreendidos, é um fator de risco para o desenvolvimento de lesões cancerígenas, sendo que o etanol e o seu principal metabólito são carcinogéneos conhecidos (68). Nos últimos anos, a prevalência do consumo de álcool e tabaco como principal causa de cancro da cabeça e pescoço tem vindo a diminuir, resultando numa maior incidência de cancro causado pelo vírus do papiloma humano (15,16,69).

O consumo de álcool é um fator de risco estabelecido para o cancro da cabeça e pescoço, sendo essa relação maior entre o cancro da orofaringe e hipofaringe do que os da cavidade oral ou da laringe (68).

Segundo o Registo Oncológico Nacional de 2020, a incidência de tumores da cavidade oral e faringe foi de 0.16%, apresentando um maior número de casos em pacientes do sexo masculino (70).

Os subtipos de vírus de alto e baixo risco diferem uns dos outros de acordo com a sua capacidade de transformação celular, através das oncoproteínas virais codificadas pelos genes E6 e E7. Nos subtipos de alto risco estas oncoproteínas ligam-se às proteínas p53 e pRB, responsáveis pela regulação do ciclo celular, sendo consideradas proteínas supressoras de tumores. Este fenómeno leva à instabilidade do genoma, resultando em alterações genéticas que impedem a apoptose e conduzem à imortalização celular (4).

A prevenção de cancro da cabeça e pescoço tem por base a prevenção da infeção pelo vírus do papiloma humano e de outros comportamentos de risco, tais como o consumo de tabaco e de álcool. Como referido anteriormente, existem vacinas preventivas contra a infeção por HPV, apesar de não protegerem contra todos os subtipos conhecidos.

O cancro da cabeça e do pescoço tem como tratamento cirurgia, quimioterapia e radioterapia, podendo estes ser utilizados em conjunto em caso de metástases. É de notar que o tratamento escolhido varia consoante a zona anatómica, o estadió do cancro e o nível de acesso cirúrgico (71).

No entanto, o prognóstico de pacientes com cancro da cabeça e pescoço associado a HPV é mais favorável do que em pacientes não infetados, tendo taxas de sobrevivência mais elevadas em cerca de 60 a 80%, devido a uma maior radiosensibilidade dos tumores HPV positivos, o que leva a uma melhor resposta aos tratamentos de quimioterapia e radioterapia. Esta radiosensibilidade deve-se a vários mecanismos biológicos e moleculares, em particular, à desregulação nas vias de reparação do DNA, à influência de proteínas como p16 e p53 e stress oxidativo causado pelas oncoproteínas do HPV. Adicionalmente, estes pacientes são tendencialmente mais jovens e com menos comorbidades do que pacientes HPV negativos (16,67,72).

No que toca a cancros associados à infeção por HPV, estão a ser exploradas terapias alvo que interferem com as vias moleculares envolvidas na carcinogénese induzida pelo HPV. Como exemplo, os inibidores da via JAK/STAT, uma via desregulada em malignidades associadas a HPV, estão a ser estudados como potenciais alvos terapêuticos (22,73).

1.9 Objetivos

Considerando o aumento de casos de cancro associado à infeção por HPV, existe a necessidade de uma maior atenção por parte do médico dentista na identificação de lesões na cavidade oral. A utilização de métodos moleculares como auxiliares de diagnóstico torna-se cada vez mais importante, pois facilita a identificação precoce do HPV.

O objetivo deste estudo é avaliar a prevalência de HPV em amostras de saliva dos pacientes da Clínica Dentária Universitária da Faculdade de Medicina

Dentária da Universidade Católica Portuguesa em Viseu, e desenvolver um protocolo de genotipagem para determinar os subtipos de HPV presentes, de forma a contribuir para a identificação precoce de lesões malignas e potencialmente malignas na cavidade oral.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Tipo de estudo

Este trabalho de investigação consiste num estudo observacional transversal, com o objetivo de identificar os diferentes subtipos de HPV na saliva de pacientes da Clínica Dentária Universitária da Faculdade de Medicina Dentária de Viseu.

2.2 Recolha de dados

Foi elaborado um questionário, aprovado pela comissão de ética, com o objetivo de determinar os fatores de risco associados à infeção por HPV da população alvo. Este questionário foi desenvolvido tendo por base o inquérito da anamnese disponível na Clínica Dentária Universitária e pesquisa científica relevante, relativamente a fatores e comportamentos de risco, e dados epidemiológicos (4,11,33). Este questionário tem como objetivo a recolha de dados sociodemográficos e clínicos dos pacientes para posterior análise. Os dados são pseudonimizados para garantir a conformidade com as normas RGPD em vigor. O questionário foi aplicado a apenas um paciente, com carcinoma oral de células escamosas, e considerando o número limitado de pacientes com lesões malignas e potencialmente malignas na Clínica, os dados recolhidos não foram aplicados no presente trabalho. No entanto, a utilização deste questionário nas consultas de Medicina Oral na Clínica Dentária Universitária, poderia ser relevante para uma recolha de dados futura e um maior controlo de lesões malignas e potencialmente malignas associadas à infeção por HPV.

2.3 Amostra

Para validação do protocolo de genotipagem de HPV na saliva, foi usada uma amostra de conveniência, recolhida em 2021, composta por salivas de pacientes da Clínica Dentária Universitária, de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos. Adicionalmente, foram recolhidas amostras de saliva de um paciente com carcinoma oral de células escamosas e de um paciente com líquen plano oral (4,11,60).

A recolha de amostras de saliva foi feita de acordo com os protocolos desenvolvidos no SalivaTec e autorizada pela comissão de ética. Os pacientes foram instruídos, no início da consulta, acerca do procedimento de colheita de saliva não estimulada, através do qual deixaram, sem forçar, acumular saliva na boca, não engolindo. De seguida, depositaram num tubo Falcon de 50 mL, cerca de 2 a 5 mL de saliva, de modo a atingir pelo menos a marca mínima de 2 mL. Os tubos foram fechados e desinfetados com álcool a 70% e vedados com parafilme, sendo imediatamente armazenados num recipiente com gelo ou congeladas a -80°C , até as amostras serem processadas.

Após a recolha das amostras, foi feita a extração de DNA das mesmas e a subsequente amplificação pela técnica de PCR.

2.4 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de saliva e da linha celular HeLa (usada como controlo positivo para HPV-18), foi realizada usando o kit comercial *Monarch® Genomic DNA Purification Kit (New England Biolabs)*. Resumidamente, 200 μL de cada amostra foram digeridos com 10 μL de proteinase K (20 mg/mL), 3 μL de RNase A (20 mg/mL) e 100 μL de tampão de lise a 56°C . A purificação do DNA foi feita de acordo com as instruções do kit. O DNA extraído foi quantificado utilizando uma placa $\mu\text{Drop}^{\text{TM}}$ (*Thermo Scientific*) e armazenado a -20°C até análise posterior.

2.5 Amplificação por PCR

A amplificação de um fragmento do gene L1 do HPV foi feita usando 10 μM dos primers MY09/MY11, um dos pares de primers mais comumente utilizados na deteção de HPV (74). Os primers GP foram testados em dois formatos de PCR, em formato *nested* e *endpoint*, não tendo sido bem-sucedida a amplificação do DNA de HPV. Os primers 16 e 18 são específicos para estes subtipos de HPV. A sequência de todos os primers está indicada na tabela 1. As condições de amplificação consistiram numa etapa inicial de desnaturação a 94°C por 15 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 10 min.

Tabela 1- Sequência dos primers utilizados e tamanho esperado dos fragmentos obtidos por PCR

Primer	Direção	Sequência (5'-3')	Fragmento
MY11	Forward	GCM CAG GGW CAT AAY AAT GG	452 bp
MY09	Reverse	CGT CCM AAR GGA WAC TGA TC	
GP5+	Forward	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	142 bp
GP6+	Reverse	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	
18	Forward	CAC TTC ACT GCA AGA CAT AGA	457 bp
	Reverse	GTT GTG AAA TCG TCGTTT TTC A	
16	Forward	CAC AGT TAT GCA CAG AGC TGC	322 bp
	Reverse	CAT ATA TTC ATG CAA TGT AGG TGT A	

2.6 Visualização

A visualização dos fragmentos amplificados foi feita por eletroforese em gel de agarose (1%), preparado com 0.6 g de agarose em 60 mL de TAE 1x. O gel foi carregado com 3 µL de DNA *Ladder* no primeiro poço, 5 µL de Controlo Positivo (HeLa) ou de Controlo Negativo (branco) no segundo e terceiro poço, respetivamente, e 5 µL de cada amostra nos poços subsequentes. Foi deixado a correr a 80 V por 40 minutos e visualizado num *ChemiDoc MP imaging system* (Bio-Rad Laboratories).

As amostras positivas para HPV foram testadas com primers específicos para os subtipos 16 e 18 e, sendo negativas, foram enviadas para sequenciação de forma a identificar o subtipo correspondente.

3 RESULTADOS

Foram recolhidas amostras de saliva de um paciente com carcinoma de células escamosas e outro com líquen plano oral, ambos negativos para HPV. Tendo em conta o baixo número de pacientes com lesões potencialmente malignas e malignas, foram analisadas 86 amostras de saliva, previamente recolhidas a pacientes saudáveis da Clínica Dentária Universitária, entre 2021 e 2022, de ambos os sexos.

A idade dos pacientes variou entre os 21 e os 78 anos, com uma média de 43.76 anos e mediana de 40 anos. Das 86 amostras analisadas, 11 não tinham informação relativa à idade.

O grupo etário com um maior número de amostras recolhidas pertence a pacientes entre os 20 e os 29 anos de idade, com 18 amostras. O intervalo de idades entre os 70 e 79 anos teve o menor número de amostras, com apenas 7.

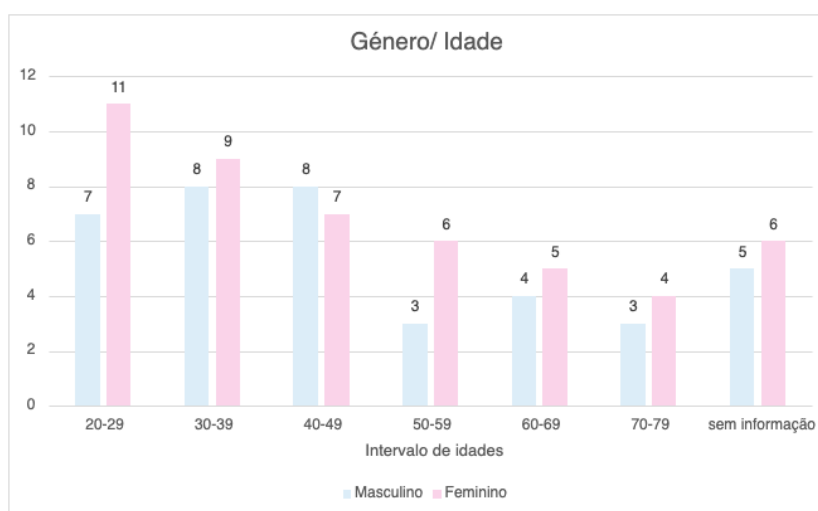


Figura 1- Distribuição das amostras estudadas de acordo com a idade e sexo dos pacientes

Das amostras analisadas, 56% foram de pacientes do sexo feminino e 44% do sexo masculino. O maior número de amostras foi de pacientes do sexo feminino entre os 20 e 29 anos de idade, e os menores de pacientes do sexo masculino entre os 50 e 59 anos e os 70 e 79.

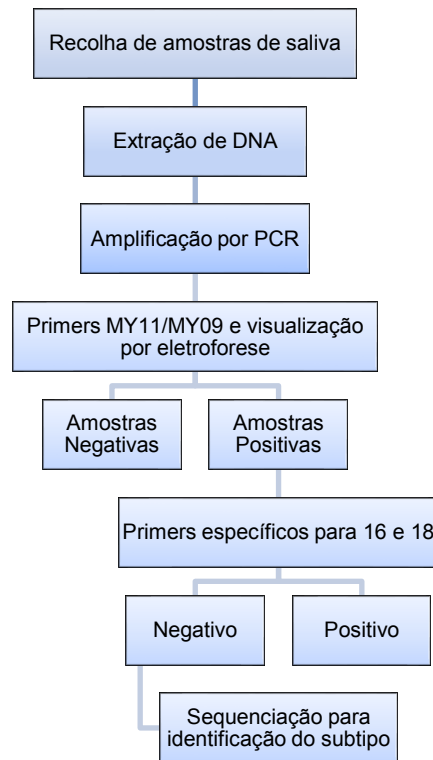


Figura 2- Resumo da abordagem molecular usada neste estudo para identificação de subtipos de HPV em amostras de saliva

Para a genotipagem de HPV nas amostras de saliva, foi seguida a estratégia ilustrada na figura 2, começando pela extração do DNA das amostras de saliva sendo, de seguida, feita a amplificação por PCR com os primers MY11 e MY09. A visualização dos fragmentos obtidos foi feita por eletroforese em gel de agarose. Nas amostras positivas para HPV, foram utilizados primers específicos para identificação dos subtipos de alto risco 16 e 18. Em caso de resultado negativo, os produtos de PCR obtidos com os primers MY foram enviados para sequenciação com o objetivo de identificar o subtipo de HPV.

Os resultados da amplificação por PCR com os primers MY são visíveis nas imagens do gel de agarose (Figuras 3 a 7), onde é possível observar duas bandas com o tamanho esperado nas amostras identificadas como 37 e 40. Estas amostras pertencem a pacientes do sexo masculino com 67 e 74 anos de idade. Através da análise das imagens, é possível determinar que estas amostras seriam positivas para infecção por HPV, devido à presença de uma

banda com 452 bp nos poços referentes a essas amostras. Estas duas amostras compõem 2.3% de todas as amostras analisadas.

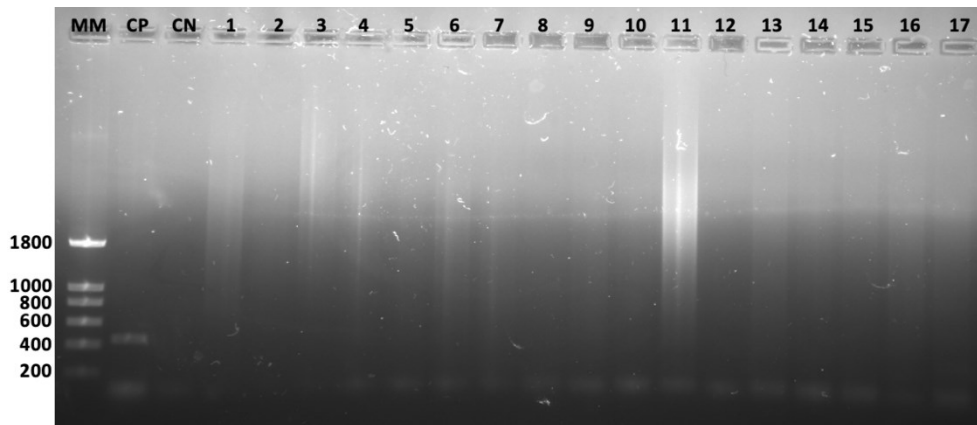


Figura 3- Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras amplificadas por PCR com primers MY09 e MY11 (amostras 1-17). Poço MM- Marcador de peso molecular DNA Ladder I. CP- Controlo Positivo. CN- Controlo Negativo. Poços 1 a 17- amostras 1 a 17

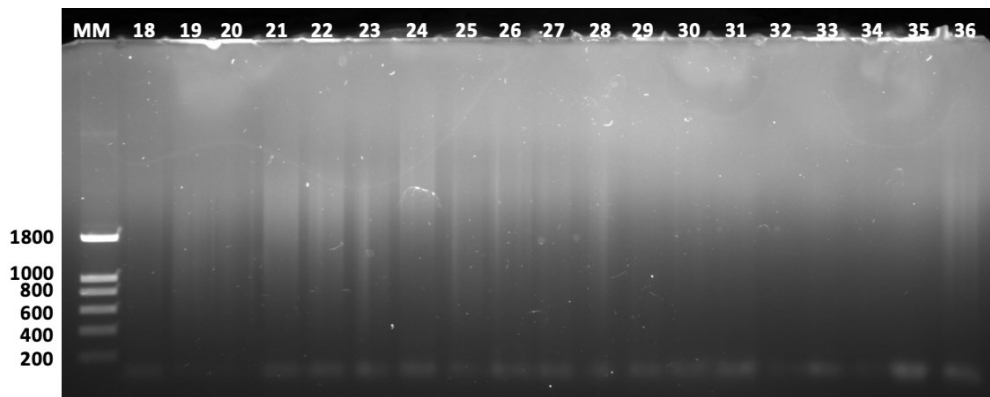


Figura 4- Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras amplificadas por PCR com primers MY09 e MY11 (amostras 18-36). Poço MM- Marcador de peso molecular DNA Ladder I. Poços 18 a 36- amostras 18 a 36

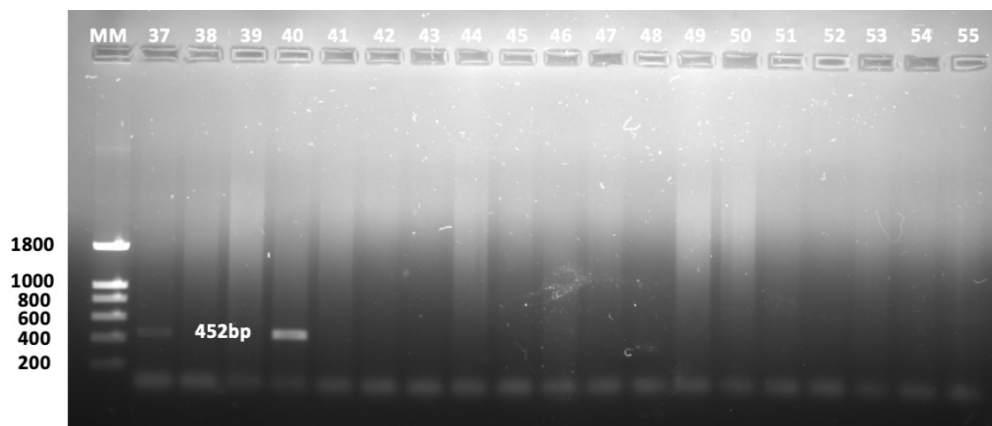


Figura 5- Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras amplificadas por PCR com primers MY09 e MY11 (amostras 37-55). Poço MM- Marcador de peso molecular DNA Ladder I. Poços 37 a 35- amostras 37 a 55. Poços 37 e 40- presença de uma banda de 452 bp

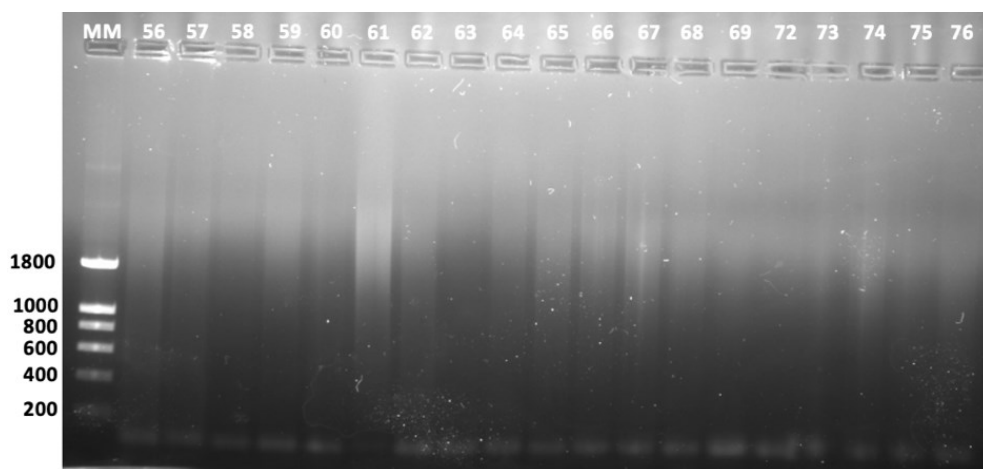


Figura 6- Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras amplificadas por PCR com primers MY09 e MY11 (amostras 56-76). Poço MM- Marcador de peso molecular DNA Ladder I. Poços 56 a 76- amostras 56 a 76

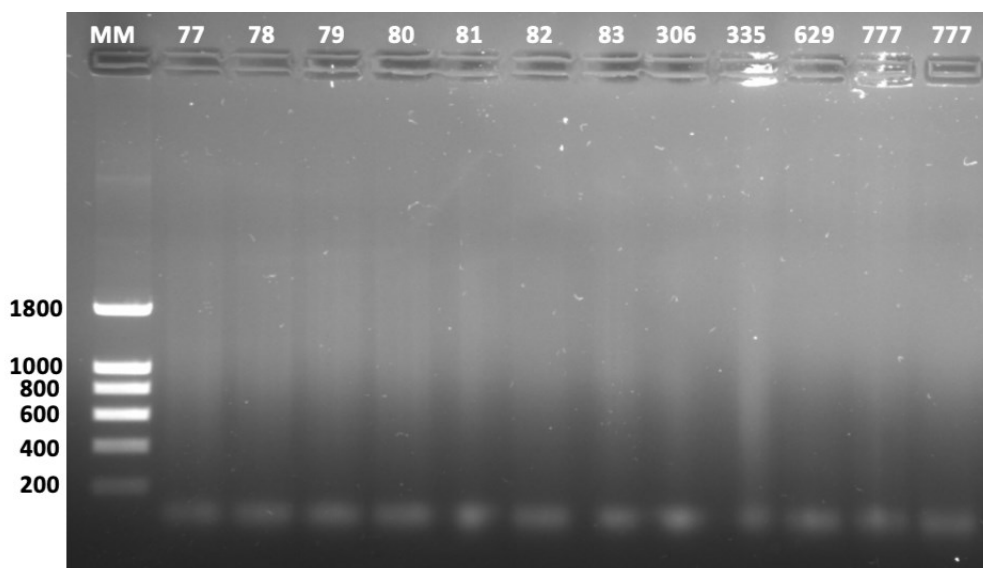


Figura 7- Eletroforese em gel de agarose 1% de amostras amplificadas por PCR com primers MY09 e MY11 (amostras 77-777). Poço MM- Marcador de peso molecular DNA Ladder I. Poços 77 a 777- amostras 77 a 777

De acordo com a metodologia ilustrada na figura 2, as amostras 37 e 40 foram amplificadas com primers específicos para os subtipos de HPV 16 e 18. Sendo este resultado negativo (dados não mostrados), as amostras foram re-amplificadas com os primers MY para sequenciação. A amostra 37 não tinha qualidade suficiente, possivelmente devido a uma baixa concentração de DNA ou à contaminação da amostra, e o eletroferograma correspondente à amostra 40 está representado na figura 8.

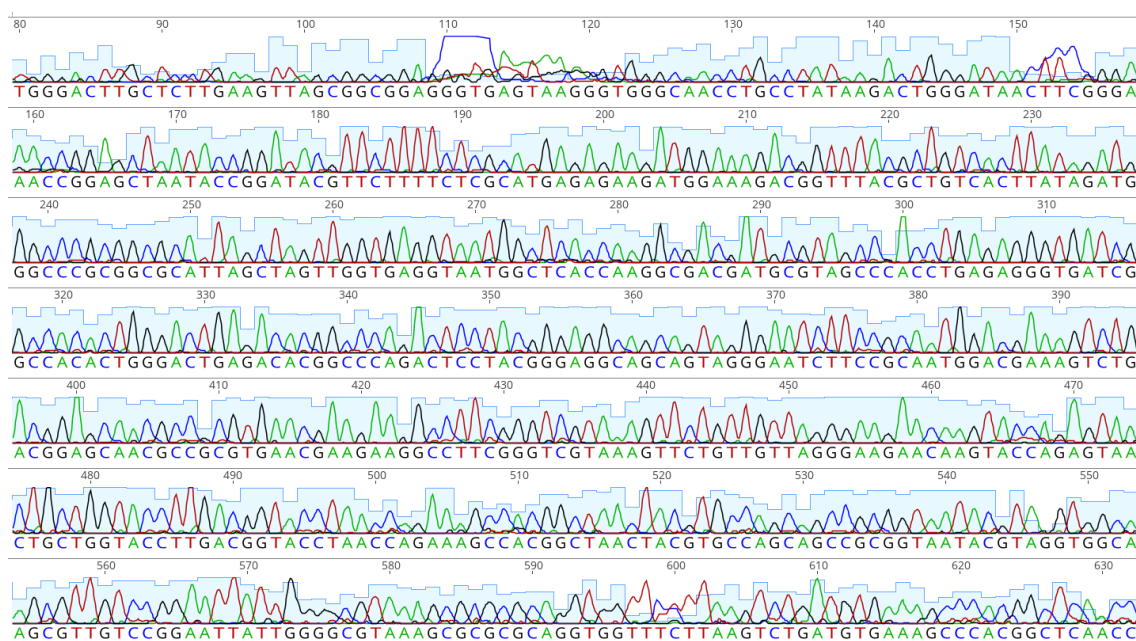


Figura 8- Eletroferograma

Após BLAST da sequência obtida, nenhum subtipo de HPV foi identificado, sendo detetadas apenas sequências de origem bacteriana como tendo maior similaridade. Desta forma, o resultado para a amostra 40 foi inconclusivo. Este resultado pode ser devido à presença de DNA bacteriano na amostra ou a uma quantidade insuficiente de DNA viral, contribuindo para a impossibilidade de identificar o subtipo de HPV presente na amostra. Existe também a possibilidade da amostra 40 ter sido um falso positivo, causado pela amplificação de DNA não-específico.

4 DISCUSSÃO

A infecção pelo vírus do papiloma humano desempenha um papel importante no desenvolvimento de vários tipos de cancro, incluindo cancro do colo do útero e cancro da cabeça e pescoço. Este vírus é atualmente um dos principais fatores de risco associados ao desenvolvimento destes cancros, particularmente por subtipos de alto risco como HPV-16 e HPV-18 (69,75). De acordo com a literatura, o carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço representa 6.5% dos casos de cancro em todo o mundo, e cerca de 25% de todos os cancros da cabeça e pescoço apresentam infecção por subtipos de alto risco de HPV, apresentando uma maior prevalência em tumores da orofaringe, de cerca de 50% (76).

A deteção da infecção por HPV é fundamental para o diagnóstico precoce e o acompanhamento de lesões potencialmente malignas, sendo o uso de amostras de saliva ideal no rastreio de HPV oral. O diagnóstico de tumores da cabeça e pescoço é muitas vezes tardio e em estadios mais avançados devido à sua localização anatómica, sobretudo os tumores da orofaringe, devido ao difícil acesso clínico e à facilidade em confundir tecido tumoral com a mucosa da base da língua e das amígdalas (76).

Deste modo, a utilização de saliva como meio diagnóstico apresenta algumas vantagens por ser de fácil colheita e não invasivo, em comparação com métodos mais agressivos como esfregaços e biópsias orais, e permitir a análise através

de técnicas de diagnóstico molecular, como o PCR (77,78). No entanto, apesar da presença de DNA de HPV na saliva já ter sido estabelecida como um biomarcador, a utilização de amostras salivares ainda não é uma prática comum, por diversas razões. Existem vários métodos de colheita de amostras orais, incluindo a recolha de saliva não estimulada ou estimulada, esfregaços de mucosa oral, bochecho com soro fisiológico e biópsias teciduais, o que pode levar a diferentes resultados (76,79). A concentração de DNA em amostras salivares pode ser insuficiente, podendo dar origem a falsos negativos devido a uma diminuição da sensibilidade (5,80). Adicionalmente, existe uma maior possibilidade de a qualidade do DNA ser comprometida, considerando a elevada carga microbiana das amostras de saliva, o que pode resultar em falsos positivos (5,76,79).

Apesar de nos últimos anos se ter verificado um aumento na investigação do HPV oral e no potencial da saliva como meio de diagnóstico, a variabilidade dos protocolos estudados e a falta de consenso acerca dos métodos de recolha de amostras e a sua respetiva análise, não permite a aplicação destes métodos de forma rotineira na identificação da infeção pelo HPV (76).

De acordo com a literatura, o rastreio de HPV baseado em amostras salivares pode também ser utilizado como método de vigilância e controlo na monitorização da recorrência do cancro antes do aparecimento de sintomas clínicos, devido à capacidade de persistência do DNA de HPV na saliva de pacientes com carcinoma oral de células escamosas, especificamente pacientes com carcinoma orofaríngeo de células escamosas associado a HPV, mesmo após o tratamento (69,81–83).

Nomeadamente, um estudo revelou que 22.2% dos seus participantes apresentaram infeção por HPV oral persistente, estando o vírus presente tanto no início do estudo como no controlo após 12 meses (84). Os autores usaram *nested* PCR em amostras de saliva com os primers MY09/11 e GP5+/6+ como método de deteção de HPV. Adicionalmente, foi detetada a presença de DNA de HPV-16 na saliva de pacientes cerca de 3.5 a 7 meses antes de ser detetada clinicamente uma recorrência de carcinoma de células escamosas, demonstrando o potencial da saliva como biomarcador (85,86). A presença de DNA de HPV-16 na saliva de pacientes pode indicar a presença de cancro residual microscópico, ou micrometástases indetetáveis através do estudo

patológico convencional ou controlos radiológicos; por outro lado, a presença de DNA de HPV pode também ser consequência da incapacidade de eliminação da infeção por HPV (86).

No entanto, apesar destas evidências, na prática clínica são maioritariamente utilizados métodos de recolha de amostras mais diretos e precisos, como biópsias teciduais ou esfregaços, de modo a confirmar a presença de HPV em cancros orais. As variações da carga viral e a sua distribuição na cavidade oral, são um desafio no uso da saliva como amostra de diagnóstico primária, sendo que as percentagens de deteção de HPV variam significativamente dependendo das técnicas utilizadas na colheita, além do local anatómico de onde as amostras são recolhidas (5,79). Estas limitações contribuem para uma reduzida utilização dos testes baseados em saliva no diagnóstico e acompanhamento de casos de HPV oral (79). No entanto, com o aprimoramento das técnicas de colheita, processamento de amostras e análise molecular, os testes de saliva têm o potencial de se tornar numa ferramenta eficaz, mais acessível e não-invasiva para o monitoramento e diagnóstico molecular do HPV oral.

Este estudo teve como objetivo a identificação de subtipos de HPV em amostras de saliva de pacientes da Clínica Dentária Universitária, com o intuito de contribuir para a deteção precoce de lesões potencialmente malignas e malignas associadas à infeção pelo vírus do papiloma humano. Das 86 amostras analisadas, apenas duas foram identificadas como positivas, ambas pertencentes a pacientes do sexo masculino, com 67 e 74 anos de idade, após amplificação por PCR e visualização por eletroforese em gel de agarose. Estas duas amostras representam 2.3% de todas as amostras analisadas. Estes resultados enquadram-se nos valores globais de prevalência de HPV oral descritos na literatura, variando entre os 0.3% e os 23.2%, dependendo das variáveis estudadas (4,80).

Num estudo realizado em indivíduos saudáveis de uma população italiana, a prevalência de HPV na orofaringe, mais especificamente em esfregaços da base da língua, foi de 0.31% numa amostra de 1285 pacientes (80). As amostras positivas pertenciam a indivíduos do sexo masculino, entre os 49 e os 62 anos, e fumadores, tendo sido testadas para a presença de 11 subtipos de alto risco de HPV e 4 de baixo risco, através da análise por PCR (80). Numa outra população italiana, composta por indivíduos jovens entre os 18 e os 30 anos, a

prevalência de HPV oral foi de 0.7%, em amostras de saliva, com 75% dos resultados positivos pertencentes a pacientes do sexo feminino e 87.5% positivos para subtipos de alto risco (79). Estes resultados foram obtidos através da genotipagem de HPV utilizando o sistema de detecção Anyplex™ II HPV28, com a capacidade de detectar, diferenciar e quantificar 28 genótipos diferentes de HPV (79). Por outro lado, Tristão *et al.* relatou uma prevalência de 23.2% numa amostra de esfregaços orais de 125 indivíduos de uma população brasileira, de ambos os sexos, com idades entre os 17 e os 54 anos, sem estes apresentarem qualquer sintoma ou manifestação clínica da infecção por HPV (4). Neste estudo, foi observada uma maior prevalência em pacientes do sexo feminino, de cerca de 70%, tendo a detecção de HPV sido feita através de PCR utilizando o set de primers MY09/11 (4).

A variabilidade nas prevalências globais descritas para HPV na cavidade oral pode ser atribuída a diversos fatores, tais como as diferenças nas populações estudadas, as variações geográficas, os métodos de diagnóstico usados, o tipo e os métodos de colheita de amostras, além do local anatômico de onde estas foram colhidas (79,87). Além dos fatores previamente referidos, o intervalo de tempo entre a infecção e a recolha das amostras pode influenciar os resultados, devido à capacidade de indivíduos jovens saudáveis de eliminar a infecção num espaço de seis a doze meses (80,88).

Neste trabalho, as duas amostras positivas para HPV foram testadas adicionalmente com primers específicos para os subtipos 16 e 18, tendo os resultados sido negativos. Apenas uma das amostras foi enviada para sequenciação, uma vez que a outra amostra não possuía intensidade suficiente para sequenciar. Os resultados da sequenciação foram inconclusivos quanto ao subtipo de HPV da amostra analisada, pelo que não podemos excluir a possibilidade de serem amplificações não específicas (falsos positivos). Um trabalho anterior realizado em amostras de saliva de 40 pacientes da Clínica Dentária Universitária revelou um resultado idêntico (89).

Este resultado pode ser devido a vários fatores, tais como a presença de múltiplas infecções por HPV na mesma amostra ou a coinfeção por outros microrganismos, além da baixa quantidade ou qualidade do DNA da amostra (79). Além dos fatores relacionados com a amostra, a escolha dos primers MY09/11 utilizados na amplificação pode igualmente ter interferido nos

resultados. O uso de primers degenerados é muito comum na detecção do vírus do papiloma humano, devido à sua capacidade de detectar uma grande variedade de subtipos de HPV. Estes primers têm como objetivo reconhecer regiões mais conservadas do genoma, permitindo a amplificação de vários genótipos diferentes em simultâneo (90–92).

No entanto, primers degenerados como MY09/11 possuem uma menor sensibilidade para subtipos específicos, sendo necessária a combinação com outros primers. A técnica de *nested*-PCR permite uma amplificação mais específica, ao dividir o processo do PCR em duas etapas com duas amplificações consecutivas. Na primeira são utilizados primers específicos para uma região do DNA; na segunda, são utilizados primers internos a essa mesma região já amplificada, o que leva a um aumento da sua sensibilidade (93,94).

A utilização dos sets de primers MY09/11 e GP5+/6+ constitui o método de PCR mais comumente utilizado na detecção da infeção por HPV, o que permite uma identificação mais abrangente de genótipos de HPV, em comparação com o uso individual destes primers (94). No entanto, no presente estudo, a amplificação com o par de primers GP não deu resultados satisfatórios.

Apesar dos primers utilizados serem comuns na amplificação de HPV, os resultados inconclusivos da sequenciação destacam a complexidade da detecção de HPV oral e a necessidade de um maior foco na investigação de meios de diagnóstico de HPV oral, de modo a melhorar o acompanhamento de lesões potencialmente malignas associadas à infeção por este vírus e desenvolver métodos de detecção precoce.

Algumas das limitações encontradas durante a elaboração desta dissertação passam pela amostra estudada. O objetivo inicial de recolha de amostras de pacientes com lesões malignas e potencialmente malignas não foi possível, devido a um número insuficiente de pacientes com estas lesões e com disponibilidade para participar no projeto. Dos dois pacientes iniciais aos quais foram feitas colheitas, e que apresentavam lesões malignas e potencialmente malignas, nenhum apresentou resultados positivos para a infeção por HPV. Deste modo, foi usada uma amostra de conveniência, não havendo dados clínicos acerca de potenciais lesões associadas à infeção por HPV, o que pode ter influenciado os resultados obtidos.

Foi também elaborado um questionário com questões relevantes acerca da infeção por HPV e aos seus fatores de risco, que acabou por ter sido aplicado apenas a um único paciente. Este questionário tinha como objetivo avaliar a ligação entre o vírus do papiloma humano e os fatores de risco apresentados pelos pacientes, bem como o conhecimento destes acerca da infeção por HPV e dos seus métodos de transmissão. Como trabalho futuro, este questionário poderá ser usado numa amostra maior de pacientes. Para além de amostras de saliva, poderão ser estudadas amostras de esfregaços ou biópsias, para deteção da infeção por HPV. Adicionalmente, para identificação de subtipos de risco, poderão ser usados métodos de imunodeteção como ELISA.

5 CONCLUSÃO

A relação entre a infeção por HPV e o desenvolvimento de cancro oral tem sido um tópico bastante estudado nos últimos anos. A prevalência de Cancro Oral associado ao HPV tem vindo a aumentar, levando a uma acrescida necessidade de investigação das suas causas, possíveis tratamentos e métodos preventivos. O médico dentista desempenha um papel fundamental na deteção precoce das lesões orais associadas ao HPV, além da instrução dos pacientes acerca de práticas de prevenção.

O diagnóstico precoce de lesões malignas e potencialmente malignas através da deteção da infeção por HPV, em especial através de amostras de saliva, tem o potencial de auxiliar na diminuição da prevalência de cancro oral, através do diagnóstico precoce destas lesões, e de contribuir para melhores desfechos clínicos, através de um adequado plano de tratamento e monitorização.

Apesar das várias vantagens da utilização da saliva como método diagnóstico e rastreio do HPV, a sua aplicação clínica continua a ser limitada, devido a uma falta de consenso acerca dos protocolos de recolha e análise de amostras utilizados.

6 BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Cancer [Internet]. 2022 [cited 2023 Jun 2]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
2. Chan CK, Aimagambetova G, Ukybassova T, Kongrtay K, Azizan A. Human Papillomavirus Infection and Cervical Cancer: Epidemiology, Screening, and Vaccination - Review of Current Perspectives. *J Oncol*. 2019;2019.
3. Mohammed S, Bakshi N, Chaudri N, Akhter J, Akhtar M. Cancer vaccines: Past, present, and future. *Adv Anat Pathol*. 2016;23(3):180–91.
4. Tristão W, Metzker R, Ribeiro P, Andrea De Oliveira C, Betiol JC, De Sousa J, et al. Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2012;78(4).
5. Syrjänen S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci*. 2018;126:49–66.
6. Kumaraswamy KL, Vidhya M. Human papilloma virus and oral infections: An update. *J Cancer Res Ther*. 2011;7(2):120–7.
7. Sohe M, Keyvani H, Soheili M, Nasser S. Human papilloma virus: A review study of epidemiology, carcinogenesis, diagnostic methods, and treatment of all HPV-related cancers. *Med J Islam Repub Iran*. 2021;35(65).
8. Nunes EM, Talpe-Nunes V, Sichero L. Epidemiology and biology of cutaneous human papillomavirus. *Clinics*. 2018;73.
9. Syrjänen S, Lodi G, von Bültzingslöwen I, Aliko A, Arduino P, Campisi G, et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: A systematic review. *Oral Dis*. 2011;17(s1):58–72.
10. De Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, Zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004;324(1):17–27.
11. de Sanjosé S, Brotons M, Pavón MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:2–13.

12. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2015 Oct 10;33(29):3235–42.
13. Wendkuuni Djigma F, Tiendrebeogo F, Traore L, Mahoukèdè Zohoncon T, Tozoula Bambara A, Abel Sorgho P, et al. Cervical Cancer Induced by Human Papillomaviruses in the Context of Africa: Contribution of Genomics. *Molecular Mechanisms in Cancer*. 2022;
14. Wood ZC, Bain CJ, Smith DD, Whiteman DC, Antonsson A. Oral human papillomavirus infection incidence and clearance: A systematic review of the literature. *J Gen Virol*. 2017;98(4):519–26.
15. Valente de Sousa P, Rodrigues J, Rodrigues CA, Carvalho L., Monteiro E, Lara Santos L. O perfil HPV dos doentes portadores de tumores da orofaringe numa instituição oncológica em Portugal entre 2018 e 2019 – Estudo Retrospectivo Descritivo. *Rev Port Cirurgia*. 2021;50:23–31.
16. Tumban E. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses*. 2019;11(10).
17. Crocetto F, Arcaniolo D, Napolitano L, Barone B, La Rocca R, Capece M, et al. Impact of sexual activity on the risk of male genital tumors: A systematic review of the literature. *Int J Environ Res Public Health*. 2021;18(16).
18. Wai KC, Strohl MP, van Zante A, Ha PK. Molecular Diagnostics in Human Papillomavirus-Related Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cells*. 2020;9(2).
19. Brown T. Southern blotting. *Curr Protoc Mol Biol*. 2001;2(1).
20. Zaravinos A, Mammas IN, Sourvinos G, Spandidos DA. Molecular detection methods of human papillomavirus (HPV). *Int J Biol Markers*. 2009;24(4):215–22.
21. Schiffman MH, Bauer HM, Lorincz AT, Manos MM, Byrne JC, Glass AG, et al. Comparison of Southern Blot Hybridization and Polymerase Chain Reaction Methods for the Detection of Human Papillomavirus DNA. *J Clin Microbiol*. 1991;29(3):573–7.
22. Araújo MG, Magalhães GM, Garcia LC, Vieira ÉC, Carvalho-Leite M de LR de, Guedes ACM. Update on human papillomavirus – Part II: complementary diagnosis, treatment and prophylaxis. *An Bras Dermatol*. 2021;96(2):125–38.
23. Szymonowicz KA, Chen J. Biological and clinical aspects of HPV-related cancers. *Cancer Biol Med*. 2020;17(4):864–78.
24. Morgan IM, Dinardo LJ, Windle B. Integration of human papillomavirus genomes in head and neck cancer: Is it time to consider a paradigm shift? *Viruses*. 2017;9(8).
25. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma-an update. *CA Cancer J Clin*. 2015;65(5):401–21.
26. Del Amo J, González C, Losana J, Clavo P, Muñoz L, Ballesteros J, et al. Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain. *Sex Transm Infect*. 2005;81(1):79–84.
27. Saldaña-Rodríguez P, Bahena-Román M, Delgado-Romero K, Madrid-Marina V, Torres-Poveda K. Prevalence and Risk Factors for High-Risk Human Papillomavirus Infection and Cervical Disorders: Baseline Findings From an Human Papillomavirus Cohort Study. *Cancer Control*. 2023;30.

28. Habiger C, Jäger G, Walter M, Iftner T, Stubenrauch F. Interferon Kappa Inhibits Human Papillomavirus 31 Transcription by Inducing Sp100 Proteins. *J Virol*. 2016;90(2):694–704.
29. Hartwig FP, Entiauspe LG, Nunes EM, Rodrigues FM, Collares T, Seixas FK, et al. Evidence for an epistatic effect between TP53 R72P and MDM2 T309G SNPs in HIV infection: A cross-sectional study in women from south Brazil. *PLoS One*. 2014;9(2).
30. Hernandez AL, Efird JT, Holly EA, Berry JM, Jay N, Palefsky JM. Incidence of and risk factors for type-specific anal human papillomavirus infection among HIV-positive MSM. *AIDS*. 2014;28(9):1341–9.
31. Pista A, De Oliveira CF, Cunha MJ, Paixao MT, Real O. Risk factors for human papillomavirus infection among women in Portugal: The CLEOPATRE Portugal Study. *Int J Gynaecol Obstet*. 2012;118(2):112–6.
32. Li Y, Liu M, Huang P, Wang W, Jiang Y, Yang Z, et al. The lifestyle factors of physical activity and diet balance associated with HPV infection in China: The cross-sectional study. *Front Oncol*. 2022;12.
33. D’Souza G, Wentz A, Kluz N, Zhang Y, Sugar E, Youngfellow RM, et al. Sex Differences in Risk Factors and Natural History of Oral Human Papillomavirus Infection. *J Infect Dis*. 2016;213(12):1893–6.
34. Lim A, Ngeow J. The Skin in Cowden Syndrome. *Front Med*. 2021;8.
35. Madera M, Amador LT, Acosta CL. Therapeutic options in unresectable oral squamous cell carcinoma: A systematic review. *Cancer Manag Res*. 2021;13:6705–19.
36. Santacroce L, Di Cosola M, Bottalico L, Topi S, Charitos IA, Ballini A, et al. Focus on hpv infection and the molecular mechanisms of oral carcinogenesis. *Viruses*. 2021;13(4).
37. Syrjänen S, Syrjänen K. Hpv-associated benign squamous cell papillomas in the upper aero-digestive tract and their malignant potential. *Viruses*. 2021;13(8).
38. Mortazavi H, Safi Y, Baharvand M, Rahmani S, Jafari S. Peripheral Exophytic Oral Lesions: A Clinical Decision Tree. *Int J Dent*. 2017;2017.
39. Castro TMPG, Neto CER, Scala KA, Scala WA. Manifestações orais associadas ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais: revisão sistemática. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004;70(4):546–50.
40. Carrozzo M, Porter S, Mercadante V, Fedele S. Oral lichen planus: A disease or a spectrum of tissue reactions? Types, causes, diagnostic algorhythms, prognosis, management strategies. *Periodontol 2000*. 2019;80(1):105–25.
41. Vijayan A, Muthukrishnan A, Nair A, Fathima S, Nair P, Roshan J. PCR-based evaluation of human papillomavirus genotypes in oral lichen planus. *J Pharm Bioallied Sci*. 2022;14(5):449.
42. Agha-Hosseini F, Hafezi Motlagh K. The correlation between human papillomavirus and oral lichen planus: A systematic review of the literature. *Immun Inflamm Dis*. 2023;11(8).
43. Chrcanovic BR, Cruz AF, Trindade R, Gomez RS. Dental implants in patients with oral lichen planus: A systematic review. *Medicina (Lithuania)*. 2020;56(2).
44. Porter S, Gueiros LA, Leão JC, Fedele S. Risk factors and etiopathogenesis of potentially premalignant oral epithelial lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2018;125(6):603–11.
45. Tilakaratne WM, Jayasooriya PR, Jayasuriya NS, De Silva RK. Oral epithelial dysplasia: Causes, quantification, prognosis, and management challenges. *Periodontol 2000*. 2019;80(1):126–47.

46. Ereira AT, Navarro AFR, Robayo DAG. Human papillomavirus, Epstein–Barr virus, and *Candida albicans* co-infection in oral leukoplakia with different degrees of dysplasia. *Clin Exp Dent Res*. 2021;7(5):914–23.
47. Yete S, D’Souza W, Saranath D. High-Risk Human Papillomavirus in Oral Cancer: Clinical Implications. *Oncology (Switzerland)*. 2018;94(3):133–41.
48. Peng Q, Wang Y, Quan H, Li Y, Tang Z. Oral verrucous carcinoma: From multifactorial etiology to diverse treatment regimens. *Int J Oncol*. 2016;49(1):59–73.
49. Li Q, Hu Y, Zhou X, Liu S, Han Q, Cheng L. Role of oral bacteria in the development of oral squamous cell carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(10):1–18.
50. Augustin JG, Lepine C, Morini A, Brunet A, Veyer D, Brochard C, et al. HPV Detection in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: What Is the Issue? *Front Oncol*. 2020;10.
51. Caldeira PC, Soto AML, de Aguiar MCF, Martins CC. Tumor depth of invasion and prognosis of early-stage oral squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *Oral Dis*. 2020;26(7):1357–65.
52. Li J, Liu S, Li Z, Han X, Que L. Prognostic Value of Perineural Invasion in Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Oncol*. 2021;11.
53. Moulin C, Beaupain B, Suarez F, Bertrand Y, Beaussant SC, Fischer A, et al. CXCR4 WHIM syndrome is a cancer predisposition condition for virus-induced malignancies. *Br J Haematol*. 2024;204(4):1383–92.
54. Kawai T, Malech HL. WHIM syndrome: Congenital immune deficiency disease. *Curr Opin Hematol*. 2009;16(1):20–6.
55. Bachelier F. CXCL12/CXCR4-axis dysfunctions: Markers of the rare immunodeficiency disorder WHIM syndrome. *Dis Markers*. 2010;29:189–98.
56. Tampa M, Sarbu MI, Matei C, Mitran CI, Mitran MI, Caruntu C, et al. Photodynamic therapy: A hot topic in dermato-oncology (Review). *Oncol Lett*. 2019 May 1;17(5):4085–93.
57. Schiller J, Lowy D. Explanations for the high potency of HPV prophylactic vaccines. *Vaccine*. 2018;36(32):4768–73.
58. Chabeda A, Yanez RJR, Lamprecht R, Meyers AE, Rybicki EP, Hitzeroth II. Therapeutic vaccines for high-risk HPV-associated diseases. *Papillomavirus Res*. 2018;5:46–58.
59. Direção Geral de Saúde. Programa Nacional de Vacinação 2020. 2020.
60. Ayesha N, Aboulaghras S, Jahangeer M, Riasat A, Ramzan R, Fatima R, et al. Physiopathology and effectiveness of therapeutic vaccines against human papillomavirus. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021;28(35):47752–72.
61. Berman TA, Schiller JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. *Cancer*. 2017;123(12):2219–29.
62. Canning M, Guo G, Yu M, Myint C, Groves MW, Byrd JK, et al. Heterogeneity of the head and neck squamous cell carcinoma immune landscape and its impact on immunotherapy. *Front Cell Dev Biol*. 2019;7(APR).
63. De Gregorio V, Urciuolo F, Netti PA, Imperato G. In vitro organotypic systems to model tumor microenvironment in human papillomavirus (HPV)-related cancers. *Cancers (Basel)*. 2020;12(5).
64. Barros MR, De Melo CML, Barros MLCMGR, De Cássia Pereira De Lima R, De Freitas AC, Venuti A. Activities of stromal and immune cells in HPV-related cancers. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1).

65. Sund DT, Brouwer AF, Walline HM, Carey TE, Meza R, Jackson T, et al. Understanding the mechanisms of HPV-related carcinogenesis: Implications for cell cycle dynamics. *J Theor Biol.* 2022;551–552.
66. Yang X, Cheng Y, Li C. The role of TLRs in cervical cancer with HPV infection: A review. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2.
67. Payaradka R, Ramesh PS, Vyas R, Patil P, Rajendra VK, Kumar M, et al. Oncogenic viruses as etiological risk factors for head and neck cancers: An overview on prevalence, mechanism of infection and clinical relevance. *Arch Oral Biol.* 2022;143.
68. Kawakita D, Matsuo K. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer and Metastasis Rev.* 2017;36(3):425–34.
69. Tang KD, Kenny L, Frazer IH, Punyadeera C. High-risk human papillomavirus detection in oropharyngeal cancers: Comparison of saliva sampling methods. *Head Neck.* 2019;41(5):1484–9.
70. Registo Oncológico Nacional de todos os tumores na população residente em Portugal, em 2020 [Internet]. 2023. Available from: <https://ron.min-saude.pt/media/2223/ron-2020.pdf>
71. Chow LQM. Head and Neck Cancer. Longo DL, editor. *N Engl J Med.* 2020;382(1):60–72.
72. Psyrris A, Burtness B. Viruses in head and neck cancers: Prevention and therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2008;8(9):1365–71.
73. Morgan EL, Macdonald A. Manipulation of JAK/STAT signalling by high-risk HPVs: Potential therapeutic targets for HPV-associated malignancies. *Viruses.* 2020;12(9).
74. Hettmann A, Demcsák A, Bach Á, Decsi G, Dencs Á, Pálinkó D, et al. Prevalence and genotypes of human papillomavirus in saliva and tumor samples of head and neck cancer patients in Hungary. *Infect Genet Evol.* 2018;59:99–106.
75. Ahn SM, Chan JYK, Zhang Z, Wang H, Khan Z, Bishop JA, et al. Saliva and plasma quantitative polymerase chain reaction-based detection and surveillance of human papillomavirus-related head and neck cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;140(9):846–54.
76. Zhao M, Rosenbaum E, Carvalho AL, Koch W, Jiang WW, Sidransky D, et al. Feasibility of quantitative PCR-based saliva rinse screening of HPV for head and neck cancer. *Int J Cancer.* 2005;117(4):605–10.
77. de Souza MMA, Hartel G, Whiteman DC, Antonsson A. Detection of oral HPV infection – Comparison of two different specimen collection methods and two HPV detection methods. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;90(4):267–71.
78. Kumari B, Ali A, Sharma A, Gehlot A, Sharma S. Non-invasive saliva-based screening of high-risk Human Papilloma Virus 16 and 18 in healthy young adults and creating awareness about its vaccination. *J Family Med Prim Care.* 2021;10(1):387.
79. Napolitano F, Angelillo S, Bianco A, Di Giuseppe G, Di Onofrio V, Licata F, et al. Genital and Oral HPV Geno-Prevalence Measured through Urine and Saliva Samples in Young Adults in Italy. *Vaccines (Basel).* 2024;12(2).
80. Palmieri A, Lauritano D, Pellati A, Scapoli L, Arcuri C, Baggi L, et al. Prevalence of Human Papillomavirus in the Oropharynx of Healthy Individuals in an Italian Population. *J Clin Med.* 2022;11(7).
81. Entiauspe L, Nunes E, Collares T, Silveira MF da, Seixas F. Comparison between two methods for molecular characterization of human papillomavirus. *J Bras Doenças Sex Transm.* 2013;25(1):13–5.

82. Tang KD, Baeten K, Kenny L, Frazer IH, Scheper G, Punyadeera C. Unlocking the potential of saliva-based test to detect HPV-16-driven Oropharyngeal cancer. *Cancers (Basel)*. 2019;11(4).
83. Quimby AE, Lagiou P, Purgina B, Corsten M, Johnson-Obaseki S. Salivary HPV Persistence Following Treatment of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2022;131(10):1053–9.
84. Sethi S, Ju X, Antonsson A, Canfell K, Smith MA, Garvey G, et al. Oral HPV Infection among Indigenous Australians; Incidence, Persistence, and Clearance at 12-Month Follow-up. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2022;31(3):604–13.
85. Biron VL, Kostiuk M, Isaac A, Puttagunta L, O’Connell DA, Harris J, et al. Detection of human papillomavirus type 16 in oropharyngeal squamous cell carcinoma using droplet digital polymerase chain reaction. *Cancer*. 2016;122(10):1544–51.
86. Chuang AY, Chuang TC, Chang S, Zhou S, Begum S, Westra WH, et al. Presence of HPV DNA in convalescent salivary rinses is an adverse prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2008;44(10):915–9.
87. Rajendra Santosh AB, Christian NA, Jones T, Thoms-Rodriguez CAA, Condappa A, Thompson T, et al. Molecular epidemiology of human papillomavirus genotypes in oral rinses from HIV-positive and HIV-negative Jamaican patients. *J Investig Clin Dent*. 2019;10(1):e12365.
88. Zhang C, Liu F, Pan Y, Deng Q, Li X, He Z, et al. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection: A population-based cohort study in rural China. *Oncotarget*. 2017;8(35):59831–44.
89. Galo A de A. Prevalência de HPV na saliva da população da clínica dentária universitária da UCP-Viseu. [Viseu]: Universidade Católica Portuguesa; 2012.
90. Gheit T, Landi S, Gemignani F, Snijders PJF, Vaccarella S, Franceschi S, et al. Development of a sensitive and specific assay combining multiplex PCR and DNA microarray primer extension to detect high-risk mucosal human papillomavirus types. *J Clin Microbiol*. 2006;44(6):2025–31.
91. Winder DM, Ball SLR, Vaughan K, Hanna N, Woo YL, Fränzer JT, et al. Sensitive HPV detection in oropharyngeal cancers. *BMC Cancer*. 2009;9:440.
92. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, et al. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol*. 2002;40(3):902–7.
93. Júnior S, Fernandes M, Heráclio S, Souza P. Prevalência dos genótipos do papilomavírus humano: comparação entre três métodos de detecção em pacientes de Pernambuco, Brasil. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2011;33(10):315–20.
94. Fuessel Haws AL, He Q, Rady PL, Zhang L, Grady J, Hughes TK, et al. Nested PCR with the PGM1/11 and GP5 +/6 + primer sets improves detection of HPV DNA in cervical samples. *J Virol Methods*. 2004;122(1):87–93.

7 APÊNDICES



QUESTIONÁRIO

Código da amostra:

Género:

(a) Feminino

(b) Masculino

Idade:

Nacionalidade:

Nível de escolaridade:

Patologia Base:

Localização:

Intensidade:

(a) Fraca

(b) Moderada

(c) Forte

(d) Muito Forte

Frequência:



Modo:

- (a) Súbito
- (b) Lento
- (c) Insidioso
- (d) Por surtos

Evolução:

Outros sintomas:

Diagnóstico:

Visita regularmente algum médico?

- (a) Sim
- (b) Não

Por que razão?

Últimas análises:

Valores anormais:

- (a) Sim
- (b) Não

Medicação:



Está grávida?

- (a) Sim
- (b) Não
- (c) Não aplicável

Tem problemas cardíacos?

- (a) Sim
- (b) Não

Se Sim, indique quais: _____

Tem tensão alta?

- (a) Sim
- (b) Não

Sofre de Diabetes?

- (a) Sim
- (b) Não

Se Sim, de que tipo? _____

Tem Doenças de Sangue?

- (a) Sim
- (b) Não

Quando sofre um corte, sangra durante muito tempo ou demora a cicatrizar?

- (a) Sim
- (b) Não

Faz hematomas com facilidade?

- (a) Sim
- (b) Não



Costuma sangrar pelo nariz?

- (a) Sim
- (b) Não

Tem alguma doença infetocontagiosa?

- (a) Sim
- (b) Não

Se Sim, quais?

- (a) Hepatite
- (b) Tuberculose
- (c) VIH
- (d) Sífilis

Se assinalou Hepatite, indique o tipo: _____

Tem doenças de fígado?

- (a) Sim
- (b) Não

Tem problemas de estômago?

- (a) Sim
- (b) Não

Tem problemas renais?

- (a) Sim
- (b) Não

Tem epilepsia?

- (a) Sim
- (b) Não



Sofre de alguma destas doenças?

- (a) Asma
- (b) Urticária
- (c) Alergia ao pólen
- (d) Sinusite
- (e) Não
- (f) Outras

É alérgico a algum medicamento/dispositivo médico?

- (a) Sim
- (b) Não

Se respondeu Sim, indique quais:

- (a) Aspirina
- (b) Penicilinas
- (c) Sulfamidas
- (d) Tetraciclina
- (e) Anestésicos
- (f) Níquel
- (g) Crómio/Cobalto
- (h) Acrílico
- (i) Látex
- (j) Outro

Sofre/sofreu de alguma doença cancerígena?

- (a) Sim
- (b) Não

Se Sim, que região foi afetada? _____

Foi submetido a algum tratamento de Radioterapia ou Quimioterapia?

- (a) Sim
- (b) Não

Se Sim, indique qual e durante quanto tempo? _____



Outros: _____

Indique se existem doenças na família como Cancro, Diabetes, Doenças cardíacas, Alergias. Indique quais:

- (a) Cancro
- (b) Diabetes
- (c) Doenças cardíacas
- (d) Alergias

Higiene Dentária: _____

Hábitos tabágicos:

- (a) Sim
- (b) Não

Se Sim, quantos cigarros por dia? _____

Hábitos alcoólicos:

- (a) Sim
- (b) Não

Hábitos pessoais dentários: _____

Hábitos pessoais Familiares: _____



EXAME CLÍNICO INTRAORAL

Lábios: _____

Língua: _____

Palato Duro: _____

Palato Mole: _____

Pavimento da Boca: _____

Região Jugal Direita: _____

Região Jugal Esquerda: _____

Gengiva: _____

Vestíbulo e freios: _____

Glândulas Salivares e Saliva: _____

Avaliação Periodontal: _____



Tem ou teve lesões orais:

- (a) Sim
- (b) Não
- (c) Não Sei

Já ouviu falar em HPV?

- (a) Sim
- (b) Não

Sabe que existem diferentes subtipos de HPV?

- (a) Sim
- (b) Não

Das seguintes opções, quais são meios de transmissão de HPV?

- (a) Contacto Sexual
- (b) Durante o Parto
- (c) Através de beijos com troca de saliva
- (d) Abraços
- (e) Não sei

A infeção por HPV pode ocorrer na cavidade oral?

- (a) Sim
- (b) Não
- (c) Não sei

O HPV pode estar na origem de doenças como o Cancro?

- (a) Sim
- (b) Não
- (c) Não sei

Sabe que existe vacina contra o HPV?

- (a) Sim
- (b) Não



Foi-lhe administrada a vacina contra o HPV?

- (a) Sim
- (b) Não
- (c) Não sei

Tem alguma questão que não tenha sido abordada?
