

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE SAÚDE

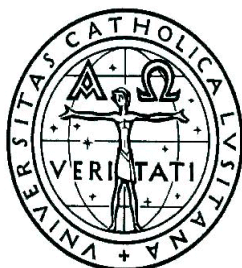
***PREVALÊNCIA DE HPV NA SALIVA DA POPULAÇÃO DA CLÍNICA DENTÁRIA
UNIVERSITÁRIA DA UCP-VISEU***

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

Por

Alexandra de Almeida Galo

Viseu, 2012



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA
CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DE SAÚDE

***PREVALÊNCIA DE HPV NA SALIVA DA POPULAÇÃO DA CLÍNICA DENTÁRIA
UNIVERSITÁRIA DA UCP-VISEU***

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

Orientadora: Prof. Doutora Maria José Correia

Por

Alexandra de Almeida Galo

Viseu, 2012

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Maria José Correia

Pela orientação, saber e ajuda

À Infogene

Pela ajuda, disponibilidade e empenho

Ao Eduardo Esteves

Pela ajuda e colaboração

Aos Pacientes

Que participaram voluntariamente no meu estudo

À minha mãe

Por ser um exemplo de coragem, força, e generosidade e por me ter ensinado a nunca desistir

Ao meu pai

Pelo apoio

Ao meu avô

Por me ter ensinado qual é o verdadeiro poder do conhecimento

Às minhas avós

Pela força e carinho

Aos meus amigos

Por me terem ajudado a crescer

RESUMO

Introdução: Os vírus do papiloma humano (HPV) são uma família de vírus de DNA não envelopados associados principalmente ao cancro do colo do útero. Contudo, há dados epidemiológicos que sugerem que o HPV desempenha um papel importante como fator de risco no desenvolvimento de cancro orofaríngeo não só como modulador do processo de malignização em tumores orofaríngeos induzidos por álcool e tabaco mas também como fator oncogénico primário na indução da carcinogénese entre não fumadores e não alcoólicos. Torna-se evidente a necessidade de mais estudos de prevalência de HPV oral entre indivíduos saudáveis no sentido de conhecer a sua distribuição e diversidade na população em geral. Deste modo, o objetivo deste estudo é precisamente realizar um rastreio em adultos saudáveis no sentido de aferir a prevalência de HPV oral em pacientes da Clínica Dentária Universitária.

Métodos: Procedeu-se à seleção de 40 pacientes saudáveis da Clínica Dentária Universitária UCP-Viseu dos quais foram recolhidas amostras de saliva e epitélio oral dos bordos laterais da língua. Realizou-se então a extração de DNA das amostras, o qual foi analisado quanto à presença de HPV por PCR (*Polimerase Chain Reaction*). Os fragmentos obtidos foram sequenciados de forma a confirmar a presença do vírus e a determinar a que tipo de HPV pertencem.

Resultados: Nas amostras recolhidas algumas revelaram a presença de fragmentos amplificados suspeitos de poder corresponder à presença de HPV na saliva. No entanto, nas reações de sequenciação foram obtidas sequências não específicas pelo que não se confirmou a presença deste vírus na amostra analisada. Sendo assim estamos perante uma prevalência de HPV oral de 0% na amostra estudada.

Conclusões: Os resultados obtidos fornecem novas informações sobre o status do HPV oral numa área geográfica ainda não caracterizada quanto à prevalência deste vírus, o que é de extrema importância em termos de saúde pública. Os dados obtidos parecem indicar que a prevalência do vírus na população é menor que noutras populações embora também seja de considerar que a amostra possa não ser representativa da população uma vez que foram analisadas apenas 40 amostras devendo estes resultados ser considerados preliminares e suportados por estudos futuros com amostras de maior dimensão. Considerando o envolvimento do HPV na etiologia do cancro orofaríngeo, revela-se pertinente realizar mais estudos epidemiológicos no âmbito do HPV oral.

Palavras chave: Vírus do papiloma humano (HPV); oral; prevalência; cancro

ABSTRACT

Introduction: The human papillomaviruses (HPV) are a family of non-enveloped DNA viruses, mainly associated with cervical cancers. However, there are epidemiologic data that suggest its role as a risk factor in the development of oropharyngeal cancers, not only as a modulator of the malignancy process in oropharyngeal tumors induced by alcohol and tobacco but also as a primary oncogenic factor in the carcinogenesis induction among non smokers and non alcoholic. More oral HPV prevalence studies in healthy individuals are needed in order to investigate the potential oncogenic risk of this virus as well as to acknowledge its distribution and diversity in the general population. Thus, the goal of this study was to perform an HPV screening in healthy adults to assess oral HPV prevalence in the University Dentistry Clinic patients.

Methods: 40 healthy patients of the UCP-Viseu University Dental Clinic were selected and submitted to saliva and lateral borders of the tongue epithelium collection. DNA was then isolated from the saliva samples and screened for HPV 6, 11, 16 and 18 through PCR. The obtained fragments were sequenced in order to confirm the virus presence and to determine to what type of HPV they belong to.

Results: Some of the collected samples revealed the presence of amplified fragments suspects of possibly corresponding to HPV presence in the saliva. However, in the sequencing reactions non-specific sequences were obtained whereby this virus presence in the analyzed population was not confirmed. Therefore the oral HPV prevalence in the studied sample is 0%.

Conclusions: The obtained results provide new information about the oral HPV status in a previously non-screened area for this virus prevalence, which is extremely important public health wise. The obtained data seems to indicate that the prevalence of the virus in the population is lower than in other populations although the sample may not be representative of the population as only 40 samples were analyzed and consequently these results should be considered preliminary and the conclusions supported by further studies with larger sample size. Considering HPV involvement in oropharyngeal cancer etiology, it becomes relevant to perform more oral HPV epidemiological studies.

Key words: Human papillomavirus (HPV); oral, prevalence, cancer

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 HPV	1
1.1.1 Constituição.....	1
1.1.2 Classificação.....	2
1.1.3 Transmissão.....	4
1.1.4 Infecção por HPV.....	4
1.1.5 Mecanismo oncogénico.....	5
1.1.6 Métodos de diagnóstico da infecção viral.....	6
1.1.6.1 Métodos Diretos	6
1.1.6.1.1 <i>Southern blot</i>	6
1.1.6.1.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)	7
1.1.6.1.3 Hibridização <i>in situ</i> (HIS)	8
1.1.6.1.4 Métodos de amplificação do sinal.....	8
1.1.6.1.5 Imunohistoquímica (IHQ) com anticorpos anti-E6-E7.....	9
1.1.6.1.6 PCR Hibridização <i>In Situ</i> (PHIS).....	9
1.1.6.2 Testes indiretos relacionados com HPV.....	9
1.1.6.2.1 Coloração imunohistoquímica para p16.....	9
1.1.6.2.2 Expressão genética: <i>Microarray</i> DNA/RNA	10
1.1.7 Prevalência	10
1.1.8 Fatores de risco.....	11
1.1.9 Prevenção	12
1.1.10 Manifestações orais da infecção por HPV	13
1.1.10.1 Hiperplasia epitelial focal.....	13
1.1.10.2 Papiloma escamoso oral	13
1.1.10.3 Condiloma acuminado oral	14
1.1.10.4 Verruga vulgaris	14
1.1.10.5 Líquen plano oral	14
1.1.10.6 Carcinoma verrucoso.....	14
1.1.10.7 Leucoplasia oral e cancro	15
1.1.10.8 Leucoplasia pilosa Oral.....	15
1.1.10.9 Carcinoma das células escamosas oral.....	15

1.1.10.10 Síndrome de WHIM	15
1.2 HPV e cancro	16
1.2.1 Cancro do colo do útero	16
1.2.1.1 HPV e cancro do colo do útero	16
1.2.2 Cancro da cabeça e pescoço	16
1.2.2.1 HPV e cancro da cabeça e pescoço	17
1.2.2.1.1 HPV e cancro orofaríngeo	17
1.2.2.1.2 HPV e cancro não orofaríngeo	18
1.2.2.1.3 Cancros orofaríngeos HPV-positivos	19
1.2.3 Cancro do pênis	19
1.2.4 Cancro da vulva	19
1.2.5 Cancro da vagina	20
1.2.6 Cancro do ânus	20
1.2.7 Cancro da pele	20
1.2.8 Cancro da conjuntiva	21
1.2.9 Cancro da mama	21
1.3 Vacinas contra o HPV	22
1.3.1 Vacinas preventivas	22
1.3.1.1 Vacinas contra o cancro do colo do útero	22
1.3.1.2 Vacinas contra o cancro da cabeça e pescoço	24
1.3.2 Vacinas terapêuticas	24
2.OBJETIVOS	27
3. METODOLOGIA	31
3.1 Tipo de estudo	31
3.2 Amostra	31
3.3 Recolha de dados	31
3.4 Protocolo	31
3.5 Análise laboratorial	32
3.5.1 – Protocolo de extração de DNA fenol clorofórmio	32
3.5.2 – Protocolo de PCR usado na amplificação do DNA com <i>primers</i> gerais para HPV	32
3.6 Variáveis em estudo	34
3.7 Procedimentos legais e éticos	34

4.RESULTADOS.....	37
5.DISSCUSSÃO.....	45
6.CONCLUSÃO.....	49
7.BIBLIOGRAFIA.....	53
8.1 ANEXO A - Consentimento Informado.....	65
8.2 ANEXO B.....	66
8.3 ANEXO C.....	67
Índice de tabelas.....	71
Índice de figuras.....	75

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A infecção oral por HPV, sobretudo pelos tipos de alto risco 16 e 18, tem sido descrita em vários estudos como um fator de risco no desenvolvimento de cancro orofaríngeo. Contudo, os dados da infecção oral por HPV na população portuguesa são escassos e revela-se útil averiguar a prevalência da infecção bem como a prevalência dos vários tipos de HPV presentes na população portuguesa para que possam ser tomadas medidas no âmbito das políticas de prevenção.

1.1 HPV

Os vírus do papiloma humano são pequenos vírus não envelopados, de cadeia dupla de DNA, constituídos por cerca de 7900 bases nucleotídicas, pertencentes à família *Papoviridae*, que infetam preferencialmente células epiteliais escamosas (1-3).

1.1.1 Constituição

O genoma do HPV é constituído por oito *open reading frames* (ORF), funcionalmente organizadas em dois grupos consoante a altura em que são expressas durante o ciclo de vida viral; há seis genes que se expressam precocemente, denominados E (*Early*), e dois genes que se expressam tardiamente, os L (*Late*). A esta região codificadora segue-se uma região reguladora designada de LCR. A região E é formada por genes codificadores de proteínas funcionais (E1, E2 e E4) e oncoproteínas (E5, E6 e E7), e a região L inclui duas proteínas da cápside L1 e L2. O gene E4 também é expresso nas fases finais do ciclo de vida viral. A regulação da expressão genética deste vírus é feita essencialmente a nível da transcrição (4).

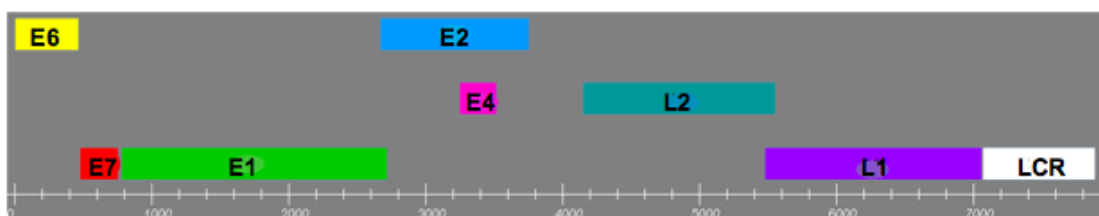


Figura 1 Constituição do genoma do HPV (4)

1.1.2 Classificação

Estes vírus são identificados através da análise da sua sequência genômica completa, e classificados por tipo. Os diferentes tipos (que correspondem a genótipos) distinguem-se com base na homologia da sequência do gene L1 da cápside proteica (5). Considera-se um novo tipo de HPV quando as sequências de nucleotídeos dos genes L1, E6 e E7 (aproximadamente 30% do genoma viral) divergem em mais de 10% dos tipos já conhecidos. Caso essa percentagem seja inferior a 2% o novo vírus isolado é designado como uma variante do mesmo tipo. Os subtipos virais correspondem a genomas cuja sequência nucleotídica nessas regiões genéticas difere entre 2 e 10% dos tipos já identificados (6).

Até à atualidade já foram identificados, em humanos, mais de 120 genótipos de HPV que podem ser encontrados no trato anogenital, uretra, pele, laringe, mucosa traqueobronquial, cavidade nasal, seio paranasal e cavidade oral. Segundo Syrjanen *et al* (2011) , o grau de risco de desenvolvimento de cancro é avaliado em baixo ou alto, de acordo com o comportamento clínico dos tecidos infetados pelo vírus (5), ao passo que, Kumaraswamy e Vidhya (2011) estratificam o fenótipo oncogénico do vírus em alto, médio ou baixo risco de acordo com as variações genotípicas da sequência base de DNA do E6 e E7 (1). Os genótipos de alto risco englobam o HPV 16 e 18, ao passo que os de médio risco abrangem o HPV 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 58, e os de baixo risco incluem o HPV 6, 11, 42, 43, 44 (1).

Em mucosa oral normal foram detetados os seguintes tipos de HPV: HPV 2, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 31, 33 e 35. Em lesões orais benignas e malignas foram detetados até à data 24 tipos: HPV 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 55, 56, 57, 58, 59, 66, 69, 72 e 73 (5).

Os HPV possuem a capacidade de infetar tanto as mucosas como os tecidos cutâneos. Deste modo, podem ser classificados segundo o seu tropismo como cutaneotrópicos e mucosotrópicos (6).

Tropismo	Alteração associada	Tipo de HPV
Cutaneotrópico (Baixo risco)	Verrugas plantares	1, 2, 4, 63
	Verrugas comuns	2, 1, 7, 4, 26, 27, 29, 41, 57, 65, 77, 1, 3, 4, 10, 28
	Verrugas vulgares (planas)	3, 10, 26, 27, 28, 38, 41, 49, 75, 76
	Outras lesões cutâneas (exs.: quistos epidérmicos, carcinoma da laringe)	6, 11, 16, 30, 33, 36, 37, 38, 41, 48, 60, 72, 73
	Epidermodisplasia verruciformis	2, 3, 10, 5, 8, 9, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 36, 37, 38, 47, 50
	Papilomatose respiratória recorrente	6, 11
	Papilomas/Carcinomas conjuntivos	6, 11, 16
	Condiloma acuminado (verrugas genitais)	6, 11, 30, 42, 43, 45, 51, 54, 55, 70
Mucosotrópico (Alto risco)	Neoplasia Intraepitelial Cervical (NIC)	
	- Não específico	30, 34, 39, 40, 53, 57, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69
	- Baixo risco (NIC I)	6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 74
	- Alto risco (NIC II)	16, 18, 6, 11, 31, 34, 33, 35, 39, 42, 44, 45, 51, 52, 56, 58, 66
	Carcinoma cervical	16, 18, 31, 45, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66, 68, 70

Tabela 1 Relação entre o tipo de HPV e a patologia associada (6)

1.1.3 Transmissão

O modo de transmissão do HPV oral ainda não se encontra totalmente clarificado. Estes vírus podem ser adquiridos durante o parto, a partir de infecções cervicais da mãe (transmissão perinatal ou vertical), e estabelecer assim infecções subclínicas latentes (1). A detecção de DNA de HPV-6 em crianças nascidas por cesariana sugere que a infecção pré-natal por HPV pode ocasionalmente ocorrer, provavelmente através de infecções ascendentes, isto é, por transmissão transplacentar (7, 8). Na maioria dos casos a transmissão é horizontal, ou seja, ocorre por via sexual (relações sexuais peno-vaginais ou peno-anais, sexo oral e sexo dígito-vaginal) ou através de fômites (roupa, lençóis, toalhas, objetos e instrumentos), dada a sua alta resistência aos efeitos letais do calor e secagem. Poderá eventualmente dar-se também a auto-inoculação do vírus de outras áreas cutâneas ou anogenitais (1, 7, 9, 10). Até à data, nenhum tipo de HPV foi detetado no sangue, sendo muito pouco provável que o vírus possa ser transmitido por via sanguínea porque não possui uma fase virémica. A transmissão de HPV através da amamentação não foi igualmente documentada. O esperma poderá ser um meio de transmissão de células associadas a HPV durante a ejaculação (7). A possibilidade de o vírus se propagar por via oral constitui uma possibilidade, sendo uma área ativa de investigação (11).

1.1.4 Infecção por HPV

As consequências clínicas da infecção variam segundo o tipo de HPV (12). A maioria das infecções por HPV são assintomáticas, auto-limitadas e transientes, com episódios que duram 4 a 20 meses, resolvendo espontaneamente ao fim de 1-2 anos, possivelmente à custa do sistema imunitário do hospedeiro para debelar a infecção (3, 10, 12, 13). Não está esclarecido e é difícil verificar empiricamente se as infecções desaparecem completamente ou se o vírus permanece latente nas células basais em quantidades não detetáveis (13).

Grande parte dos indivíduos com este tipo de infecção desenvolve uma resposta imunitária mediada por células efetiva e capaz de fazer regredir a infecção e lesões associadas. No entanto, por alguma razão, certos indivíduos não desenvolvem essa resposta e, portanto, não são capazes de eliminar a infecção. A persistência da infecção conduz à sobreexpressão de proteínas virais, perda dos mecanismos de controlo celulares, e potencial de transformação maligna, isto é, aumenta a probabilidade de displasia ou neoplasia intraepitelial e carcinomas invasivos subsequentes. Os fatores que contribuem para o atraso entre a infecção por HPV e a sua eliminação estão relacionados com o distúrbio mínimo e

lesão celular das células epiteliais infetadas, a falta de ativação de células dendríticas, e a capacidade das proteínas virais de escapar ao reconhecimento imune inato inibindo especificamente e suprimindo componentes do sistema imunitário inato (12).

1.1.5 Mecanismo oncogénico

O mecanismo oncogénico do HPV não é compreendido na totalidade. Este vírus possui a capacidade de imortalizar os queratinócitos e age sozinho mesmo que diferentes cofatores, ainda não completamente localizados, sejam necessários para a conversão maligna (1).

A possibilidade de evoluir na direção da malignidade depende de vários fatores, todos eles capazes de alterar o curso da infeção por HPV, nomeadamente: o tipo de vírus, a ação sinérgica com diferentes agentes físicos, químicos e biológicos, a constituição genética e o mecanismo de defesa imunitária do hospedeiro (1).

No caso da infeção por estirpes de HPV de alto-risco, e sob condições favoráveis, o genoma viral é integrado no genoma do hospedeiro, imortalizando assim os queratinócitos. Durante este processo de integração, a forma circular do genoma viral quebra ao nível do E1 e E2. A perda do E2 leva à perda do controlo do E6 e E7 (1).

Os genes E6 e E7, cujas proteínas constituem moléculas críticas no processo de replicação viral, são os responsáveis pela conversão maligna das células tumorais do HPV+ (9, 14). A oncoproteína E6 liga-se e promove a degradação da proteína supressora tumoral p53, diminuindo a capacidade apoptótica da célula. A oncoproteína E7 liga-se à proteína retinoblastoma pRb; isto resulta na entrada da célula na fase S, conduzindo à disrupção do ciclo celular, a proliferação celular e a transformação maligna (15).

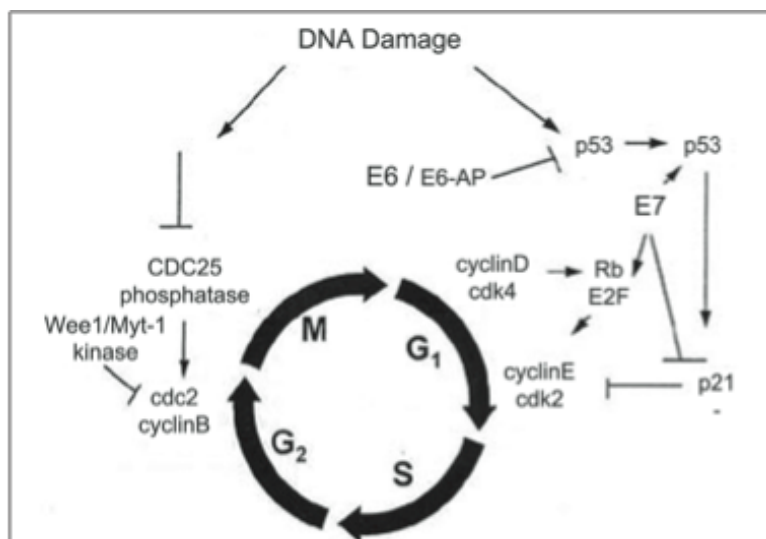


Figure 2 Modelo de interação do HPV E6 e E7 com a via de dano ao DNA (1)

1.1.6 Métodos de diagnóstico da infecção viral

O HPV não pode ser cultivado em culturas de células convencionais e os ensaios serológicos são limitados em termos de precisão. A serologia não é adequada na distinção entre infecções presentes e passadas pois as infecções por HPV são seguidas de uma resposta imunitária humoral contra proteínas da cápside maior, sendo que os anticorpos permanecem detetáveis durante muitos anos. Desta forma, o diagnóstico rigoroso da infecção por HPV assenta na deteção de ácidos nucleicos virais (16).

1.1.6.1 Métodos Diretos

1.1.6.1.1 Southern blot

Durante a hibridização *Southern blot* o genoma do HPV é extraído de um espécime e a cadeia de DNA é quebrada recorrendo a enzimas. Posteriormente, o produto é sujeito a electroforese em gel. Os fragmentos de DNA separados através deste método são transferidos para uma membrana de nitrocelulose e hibridizados com sondas genómicas de HPV clonado, marcadas com radioisótopos ou fluorescência. A deteção dos híbridos de DNA marcados é indicativa da presença de HPV numa determinada amostra (1).

Esta técnica possui alta especificidade e permite fazer a distinção entre DNA episomal ou integrado, conseguindo detetar números de cópias de DNA viral muito baixas (até 0,1

cópias por célula). Contudo, não é facilmente aplicável a amostras de tecido fixado com formalina e embebido em parafina, e não tem atualmente utilização clínica/prática (17).

1.1.6.1.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

No PCR, uma sequência de DNA ou RNA é amplificada através de: vários ciclos de desnaturação a altas temperaturas, ligação de *primers* oligonucleotídeos complementares a temperaturas mais baixas, e replicação de DNA a uma temperatura intermédia por uma polimerase DNA resistente ao calor (17). Os sistemas de amplificação mais usados na detecção de DNA-HPV em amostras clínicas baseiam-se em conjuntos de *primers* de consenso MY09/MY11 e GP5+/GP6+ mediados por PCR, amplificando fragmentos de DNA na região L1 conservada de aproximadamente 450bp e 150 bp respetivamente (18, 19). O set de *primers* MY09-MY11 é sintetizado com uma série de nucleótidos degenerados em cada *primer*, sendo assim uma mistura de 25 *primers*, incluindo o HMB01, capaz de amplificar um largo espectro de genótipos de HPV, com vários graus de sensibilidade (18, 20). O par de *primers* GP5+/GP6+ consiste numa sequência fixa de nucleótidos para cada *primer* e é capaz de detetar uma vasta gama de tipos de HPV usando uma temperatura de ligação baixa durante o PCR (18).

No PCR em tempo real os *primers* específicos são combinados com sondas fluorescentes a fim de realizar detecção em tempo real permitindo ainda uma quantificação do número de cópias inicial (16).

No PCR com transcriptase reversa é incorporado um passo em que é usada a transcriptase reversa antes da amplificação pelo PCR de modo a copiar RNA para DNA complementar sendo depois esta molécula usada como molde numa reação de PCR idêntica às descritas anteriormente (16).

O PCR apresenta alta sensibilidade, rentabilidade e encontra-se amplamente disponível quer para investigação quer para diagnóstico. Esta técnica permite avaliar todos os tipos de papilomavírus para além do HPV16. Existem vários conjuntos de *primers* desenhados para a detecção do HPV sendo que alguns como os *primers* SPF10 são capazes de amplificar amostras de DNA altamente degradadas. No entanto, alguns *primers* têm baixa especificidade, não fornecendo nenhuma medida quantitativa da carga viral, nem a confirmação de que o vírus está transcricional activo. Outra limitação prende-se com o fato de que não permite fazer a distinção entre DNA integrado e episomal, ou a distinção entre HPV oncogénico mais células, e HPV não oncogénico mais células (17).

1.1.6.1.3 Hibridização *in situ* (HIS)

A HIS pode ser efetuada diretamente nas biópsias, fato que permite a localização das sequências alvo e a correlação com aparência clínica e histopatologia (1). Neste método, o procedimento de detecção de HPV ocorre inteiramente dentro do núcleo da célula infetada. O resultado da reação de hibridização é avaliado microscopicamente e o aparecimento de um precipitado apropriado dentro do núcleo das células epiteliais é indicativo da presença de HPV nos espécimes testados. É possível também avaliar o estado físico do vírus pela presença de sinais pontuais para vírus integrados e sinais difusos para vírus episomais. Desta forma, a HIS, ao contrário do PCR, permite detetar a infeção clinicamente relevante (17).

Com esta técnica consegue-se uma especificidade de 100% e a capacidade de fazer a distinção entre DNA integrado ou episomal, existindo testes comerciais disponíveis (17, 21). Todavia, não apresenta sensibilidade suficiente e é tecnicamente difícil para ser usada em exames de rotina (17).

1.1.6.1.4 Métodos de amplificação do sinal

Estas técnicas baseiam-se num passo inicial de hibridização dos ácidos nucleicos no espécime com sondas alvo-específico depois do qual o sinal é amplificado e posteriormente visualizado por meio de um dos outros meios (17).

O teste de Captura Híbrida 2 constitui o teste diagnóstico de HPV mais importante da última década e continua a ser um dos mais usados nos programas de rastreio de cancro cervical. Estudos demonstram a sua utilidade na detecção de HPV tanto em lesões do cérvix como da orofaringe (17). Este método permite detetar 13 tipos de HPV de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e 5 tipos de baixo risco (6,11, 42, 43 e 44) (17, 22). O teste Cervarista HPV HR tem como alvo 14 tipos de HPV de alto-risco (17).

Estes métodos de detecção de HPV, aprovados pela *Food and drug administration (FDA)*, são tecnicamente fáceis de realizar (17). No entanto, não fornecem informações acerca do tipo específico de HPV que foi detetado gerando resultados positivos quando pelo menos um dos 18 tipos está presente, não permitem distinguir entre DNA integrado ou episomal, nem entre HPV neoplásico mais células e HPV não neoplásico mais células (17, 23).

1.1.6.1.5 Imunohistoquímica (IHQ) com anticorpos anti-E6-E7

Apesar da coloração IHQ contra p16 ser frequentemente usada como marcador substituto do HPV, até à data esta técnica nunca foi usada contra proteínas específicas de HPV. Não obstante, o desenvolvimento da coloração IHC contra proteínas oncogénicas E6 e E7 poderia eventualmente apresentar uma série de potenciais vantagens em relação a outros métodos de deteção, tais como: a capacidade de provar que DNA HPV está a ser expresso e a deteção de oncoproteínas HPV. Não existem kits comerciais disponíveis e os dados relativos à sua utilização prática/clínica são escassos (17).

1.1.6.1.6 PCR Hibridização *In Situ* (PHIS)

O PCR é realizado usando os reagentes típicos em slides de tecido fixado com formalina e embebido em parafina. O *slide* é depois lavado, desidratado em álcool e seco. Os produtos do PCR presentes no *slide* são hibridizados com sondas específicas de DNA tal como na HIS. Este método possui alta sensibilidade e especificidade. Contudo, apresenta uma elevada dificuldade técnica, não havendo dados relativos à sua utilização prática/clínica (17).

1.1.6.2 Testes indiretos relacionados com HPV

1.1.6.2.1 Coloração imunohistoquímica para p16

Esta técnica, acessível à maioria dos laboratórios, possui uma sensibilidade de quase 100% na deteção de carcinoma das células escamosas (CCE) associados a HPV, isto porque a proteína E7 do HPV-HR se liga ao Rb levando ao aumento da expressão do regulador p16 nuclear. É facilmente aplicada em tecidos fixados com formalina e embebidos em parafina e permite a deteção da presença de vírus transcripcional activo através de um marcador do mecanismo de *feedback* da célula hospedeira. Porém, funciona como um marcador substituto, a sua sensibilidade é menor que a relatada para a existência de HPV positivo, e a especificidade não é a ideal (17).

1.1.6.2 Expressão genética: *Microarray* DNA/RNA

O *microarray* de DNA é uma compilação de pontos de DNA microscópicos numa superfície sólida ligada covalentemente a uma matriz química (1). Cada ponto de DNA contém picomoles de sequências específicas de DNA, conhecidas por sondas. Cada ponto tem uma sequência única diferente das outras no *array* e vai hibridizar apenas com a sua cadeia complementar. Estes podem ser uma secção pequena de um gene ou outro elemento de DNA usados para hibridizar cDNA ou cRNA sob condições de alto rigor. A hibridização com sondas alvo é geralmente detetada e quantificada pela deteção de alvos marcados por fluoróforo-, prata-, ou quimiluminescência para determinar a abundância relativa de sequências de ácidos nucleicos no alvo (17).

Este método permite a identificação de: retratos moleculares de perfis de expressão genética em carcinomas das células escamosas da cabeça e pescoço (CCECP) HPV-positivos e negativos; subgrupos de CCECP com perfis de expressão genética relacionados com diferentes prognósticos. Tem custos elevados, os perfis de expressão genética preditivos são ainda elusivos, e não existe consenso quanto ao uso preferencial de material celular epitelial puro ou material de biópsias recentes (17).

1.1.7 Prevalência

A infeção por HPV nas suas várias formas é uma das mais prevalentes a nível mundial afetando mais de 440 milhões de indivíduos (24). A prevalência da infeção por HPV parece variar geograficamente e segundo uma meta-análise recente, estima-se que a prevalência global média de HPV genital em mulheres é de 11,7%. Foi observada uma maior prevalência na África e América latina comparativamente à Europa, América do norte e Ásia (25). Nos homens, a prevalência de HPV genital está entre 1 e 84% em homens sexualmente ativos de baixo risco, e entre 2 e 93% em homens de alto risco (26).

Segundo alguns estudos a infeção varia também com a idade e o HPV oral pode ser detetado em 1,5% dos indivíduos entre os 12-15 anos, e em 3,3% dos indivíduos com 16-20 anos (27, 28) A prevalência de HPV oral é maior entre adultos, tendo sido detetado em cerca de 4,5% dos adultos saudáveis (29). Um estudo multinacional levado a cabo por Kreimer *et al* em homens saudáveis dos Estados Unidos, México e Brasil, entre os 18 e os 74 anos, detetou DNA HPV oral em 67 de 1680, cerca de 4.0% (30).

No que se refere à influência do sexo na infeção, num estudo que integra homens que têm relações sexuais com homens e são negativos para o vírus da imunodeficiência

humana (HIV), foi detetada uma prevalência de infeção por HPV anal de 57% (31). No entanto, entre homens heterossexuais, essa prevalência é geralmente menos que 10% (32). No que diz respeito às mulheres, a prevalência e incidência de HPV anal é frequentemente igual ou superior à infeção com HPV cervical (33).

Atualmente, não existem dados estatísticos sobre a prevalência da infeção nem relativos aos genótipos do vírus mais prevalentes a nível da cavidade oral na população portuguesa. Contudo, a infeção cervical por HPV encontra-se quantificada pelo CLEOPATRE, o primeiro estudo deste âmbito realizado a nível nacional. Cerca de 2326 mulheres de Portugal continental foram testadas sendo que o vírus foi detetado em 19,4%, com maior incidência entre os 18 e os 24 anos. O tipo de alto risco mais comum foi o HPV-16 (34). Um estudo realizado nos Açores na ilha Terceira demonstrou uma prevalência de HPV cervical de 10,49% em 289 mulheres (35).

1.1.8 Fatores de risco

Os marcadores de atividade sexual, nomeadamente o número de parceiros sexuais recentes/vida e a idade da primeira relação sexual, têm sido consistentemente relatados como sendo dos fatores de risco mais importantes na infeção por HPV (10). A idade da primeira relação sexual aumenta o risco de infeção na medida em que idades mais jovens de iniciação da atividade sexual estão associadas a um maior número de parceiros sexuais (10, 13). Também mecanismos biológicos, incluindo imaturidade cervical, produção inadequada de muco cervical protetor e ectopia cervical aumentada poderão tornar mulheres jovens e adolescentes mais susceptíveis à infeção por HPV (36). No entanto convém não esquecer que nem toda a infeção terá origem em contatos sexuais pois é possível detetar HPV em recém nascidos que embora não apresentem infeção mostram indícios de ter sido contaminados com HPV durante o parto (8).

Independentemente dos marcadores de atividade sexual, uma série de outros fatores têm sido associados à infeção por HPV, nomeadamente: idade jovem, status socioeconómico, multiparidade, circuncisão, uso de preservativo, uso de contraceptivos orais, tabagismo, nutrição, imunossupressão, carga viral, polimorfismos genéticos no sistema de Antígenos Leucocitários Humanos (ALH), infeções por HPV pré-existente, outras doenças sexualmente transmissíveis (DST) (ex: clamídia, vírus herpes simplex) (10).

A circuncisão é importante do ponto de vista da proteção contra infecções transmitidas sexualmente, porque previne a acumulação de secreções vaginais infetadas e reduz a área de superfície de epitélio não queratinizado (37).

A eficácia dos preservativos na prevenção das infecções por HPV é ainda desconhecida. Dado que o HPV não é transmissível através do espermatozoides ou outros fluídos corporais, um estudo sugere que os preservativos não protegem contra a infecção por HPV (38). A transmissão do HPV dá-se através do contato pele com pele, frequentemente afastado da área coberta pelo preservativo (39).

O tabagismo e a infecção por HIV estão associados com o aumento significativo da prevalência de HPV oral. Isto sugere que a imunossupressão relacionada com estes dois fatores poderá ter um impacto na história natural do HPV oral, ou seja, torna as infecções mais prováveis de persistir (40).

Segundo alguns estudos parece haver uma associação entre o efeito protetor contra o risco de infecção persistente, e o consumo de frutas e vegetais, e níveis circulantes e dietéticos de vitamina C e E, beta-alfa carotenos, licopenos, luteína/zeaxantina, e criptoxantina (41-43).

Existe a possibilidade de fatores virais, tais como variantes moleculares e carga viral, desempenharem um papel na persistência do HPV e progressão (44, 45).

Conjetura-se que determinados alelos ou haplotipos dos ALH poderão estar envolvidos na suscetibilidade a infecções por HPV e cancro cervical provavelmente regulando a resposta imunitária contra a infecção por HPV e em última instância interferindo no estabelecimento de infecções persistentes produtivas e no desenvolvimento de lesões (13).

A infecção cervical com outras DST's, nomeadamente a clamídia, poderá aumentar a susceptibilidade a infecções por HPV através da inflamação cervical ou de microabrasões, ou facilitar a persistência através de mecanismos imunológicos (36).

1.1.9 Prevenção

As estratégias de prevenção estão apenas estudadas no caso da infecção cervical e as mais promissoras incluem o rastreio da infecção com HPV's de alto risco e a imunização para prevenir a infecção com HPV's de alto-risco (10). O rastreio inclui o teste papanicolau e o teste DNA-HPV. O teste papanicolau é o responsável primário pela redução da mortalidade por cancro cervical na maioria dos países com altos rendimentos. No entanto, este teste tem as suas limitações, nomeadamente a sua baixa sensibilidade na deteção da

neoplasia intraepitelial cervical, que é de 51%. O teste DNA-HPV em comparação parece ser mais sensível e ligeiramente menos específico na detecção de lesões pré-cancerosas cervicais de alto grau (NIC grau 2 ou mais alto) (10).

A combinação do rastreio com a administração de vacinas profiláticas que atualmente protegem contra as estirpes mais comuns de baixo (6 e 11) e alto risco (16 e 18), oferece grande potencial na redução do cancro cervical invasivo (CCI) e outras doenças relacionadas com HPV(10).

Uma nova abordagem preventiva baseia-se em procurar inibir infeções por HPV prevalentes. Recentemente, investigadores do NIH identificaram o composto carrageenan como sendo um agente de gelificação derivado naturalmente de algas seguro e barato que serve como um potente inibidor da infeção por HPV(10).

1.1.10 Manifestações orais da infeção por HPV

A infeção oral por HPV é bastante comum e nem sempre está associada a lesões malignas. Há várias manifestações da infeção oral por HPV que se descrevem de seguida. Algumas dessas manifestações estão mais associadas a alguns tipos de vírus.

1.1.10.1 Hiperplasia epitelial focal

A hiperplasia epitelial focal ou doença de Heck é uma desordem familiar benigna rara da mucosa oral, com predileção racial pelos Nativos Americanos e Esquimós. Caracteriza-se por múltiplas elevações nodulares, sésseis, circunscritas e moles que geralmente surgem na mucosa do lábio inferior (1, 46). Está associada ao HPV 1, 6, 13 e 32 (1, 46, 47).

1.1.10.2 Papiloma escamoso oral

O papiloma escamoso oral é um tumor benigno que apesar de poder aparecer em qualquer idade e em ambos os sexos, surge mais frequentemente em indivíduos na terceira e quarta década de vida (1). Clinicamente, caracteriza-se por ser um tumor de tecidos moles, sésstil ou pedunculado, branco ou cor de rosa, com uma superfície verrucosa ou lisa. Apesar de poderem aparecer em qualquer superfície da mucosa oral situam-se geralmente na língua ou palato mole (48). A presença de HPV 6 e 11 tem sido descrita em muitos estudos de lesões (1, 47, 48).

1.1.10.3 Condiloma acuminado oral

O condiloma acuminado oral é uma lesão papilar benigna relativamente comum sobretudo em homens brancos na terceira e quarta década de vida. É geralmente assintomático e pode surgir na pele ou mucosa da cavidade oral ou região anogenital, envolvendo com maior frequência a mucosa labial, língua e pavimento da boca (49). Apresenta-se sob a forma de nódulos brancos ou cor de rosa que proliferam e coalescem para formar “crescimentos” moles e sésseis. Foram isolados deste tipo de lesão HPV 6 e 11 (1, 47, 49).

1.1.10.4 Verruga vulgaris

As verrugas são lesões exofíticas, circunscritas, sésseis, esbranquiçadas e firmes que afetam ocasionalmente a mucosa oral, com especial incidência nos lábios, palato, processo alveolar e gengiva, sobretudo em jovens adultos (1, 47). Tem sido relatada a presença nestas lesões de tipos mucosotrópicos de HPV, tais como HPV 6, 11 e 16 assim como de tipos cutâneos, nomeadamente HPV 1, 2, 4 e 7 (1, 47).

1.1.10.5 Líquen plano oral

O líquen plano oral é uma doença inflamatória crónica, de etiologia desconhecida, que afeta a mucosa oral e a pele (1, 50). Tem sido associado a doenças como a diabetes e a hipertensão, a desordens imunológicas e mais recentemente considera-se a possível etiologia viral baseada na alta percentagem de HPV encontrada nestas lesões orais (1). Até à data tem sido encontrado nestas lesões HPV 11, HPV 16 e vírus do tipo HPV 16 (1, 47, 50).

1.1.10.6 Carcinoma verrucoso

O carcinoma verrucoso representa cerca de 4.5-9% dos CCE, surgindo frequentemente na mucosa oral, gengiva e alvéolos (1, 51). Clinicamente, apresenta-se como um crescimento não metastizante, não invasivo, superficialmente expansivo, exofítico que produz lesões verrugosas, brancas ou cinzentas de crescimento lento (51). A sua etiologia não é clara, sendo que alguns estudos demonstram uma forte associação com o consumo do tabaco, álcool e atividade viral oportunista relacionada com HPV, nomeadamente de HPV 6, 11, 16 e 18 (1, 47, 51).

1.1.10.7 Leucoplasia oral e cancro

A leucoplasia oral é a lesão pré-cancerosa mais comum da mucosa oral. É definida pela organização mundial de saúde como uma mancha ou placa branca na mucosa oral não removível à raspagem e que não pode ser classificada clinicamente ou microscopicamente como outra doença (52). A sua etiologia é incerta (1). O tabaco e o álcool têm sido implicados no desenvolvimento desta lesão e tem sido sugerida uma possível etiologia viral que implica o HPV 2, 6, 11 e 16 (1, 47, 52).

1.1.10.8 Leucoplasia pilosa Oral

A leucoplasia pilosa oral é uma lesão observada frequentemente mas não exclusivamente em pacientes infetados por HIV (1). Caracteriza-se pela presença de placas brancas bilaterais, assintomáticas e frequentemente elevadas, nos bordos laterais e dorso da língua, não removíveis à raspagem (53). O vírus Epstein-Barr parece desempenhar um papel significativo na sua etiopatogenia (1). O HPV não parece estar associado a LPO, sendo que a sua deteção neste tipo de lesão é um achado casual (1, 47, 53).

1.1.10.9 Carcinoma das células escamosas oral

O CCE é o tumor maligno mais comum na cavidade oral, representando mais de 90% de todas as neoplasias malignas orais. O CCE oral afeta geralmente pacientes de meia idade e mais velhos, consumidores crónicos de tabaco e álcool. No entanto, tem-se verificado uma crescente incidência de CCE em indivíduos sem fatores de risco conhecidos (54). A possível etiologia viral que implica o HPV como fator de risco tem sido relatada (1, 47, 54).

1.1.10.10 Síndrome de WHIM

O síndrome de WHIM é uma doença herdada geneticamente que se caracteriza por neutropenia crónica, mielocatose, hipogamaglobulinemia, infeções recorrentes e verrugas (55). Tem sido relatada a presença de múltiplas verrugas cutâneas desfigurantes e suscetibilidade a carcinoma ou displasia cervical relacionado com HPV(1).

1.2 HPV e cancro

Em 2008, Harald zur Hausen, prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina, estimou que 20% de todos os casos de cancro humano estão etiologicamente associados a infeções virais (56).

As infeções por HPV são responsáveis por cerca de 5% da totalidade de cancros humanos e por pelo menos 0.5 milhões de mortes anuais devido a cancro (57).

O HPV tem sido associado a uma série de tipos de cancro, nomeadamente ao cancro do colo do útero, vulvar, vaginal e anal, e a um subconjunto de cancros da cabeça e pescoço (3).

1.2.1 Cancro do colo do útero

O cancro do colo do útero é a segunda causa mais comum de morte por cancro entre as mulheres em todo o mundo. Anualmente, cerca de 493 000 mulheres desenvolvem cancro do colo do útero, resultando numa mortalidade anual de 270 000 (58).

1.2.1.1 HPV e cancro do colo do útero

A sua etiologia é inteiramente atribuível à infeção, fato único entre os cancros humanos (57). É necessária a infeção persistente do epitélio anogenital por um tipo oncogénico de HPV para que se desenvolva cancro cervical, sendo este vírus responsável por cerca de 99,7% dos casos deste tipo de cancro (2, 57). O HPV 16 é o tipo de vírus de alto-risco mais frequentemente associado a cancro do colo do útero, tendo sido identificado em aproximadamente 50% de todos os tumores. O HPV 18 é responsável por 10-15% e os tipos 31, 33, 45, 52 e 58 por 2-5% dos casos. Desta forma, o HPV 16 e 18 são os mais comuns neste tipo de cancro pelo que têm sido o alvo de muitas vacinas em desenvolvimento contra o HPV (58).

1.2.2 Cancro da cabeça e pescoço

Os carcinomas das células escamosas da cabeça e pescoço (CCECP), que incluem cancros da cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe, trato sinonasal e nasofaringe, possuem a sexta maior incidência a nível mundial, sendo responsáveis anualmente por 355,000 mortes e 633,000 casos incidentes (59-61). O tabaco e o álcool são

tradicionalmente considerados os fatores de risco major nos CCECP. Contudo, nos últimos 10-15 anos, a infecção por HPV tem sido progressivamente reconhecida como um fator de risco major para um grupo de CCECP- os cancros da orofaringe, incluindo a base da língua, amígdalas e outras partes da faringe (59). Comparativamente com os carcinomas da cabeça e pescoço associados ao consumo de álcool e tabaco, cuja incidência se encontra em declínio ou a estabilizar nos países ocidentais, os carcinomas orofaríngeos relacionados com HPV encontram-se em ascensão, sendo mesmo considerados por alguns uma epidemia (60).

1.2.2.1 HPV e cancro da cabeça e pescoço

Em 1983, Stina Syrjanen foi a primeira a apresentar a hipótese que implica o HPV na etiologia do cancro da cabeça e pescoço (62). Recorrendo à IHQ, os autores analisaram a presença de antígenos de HPV em cerca de 40 carcinomas orais e laríngeos (63). De entre as 40 lesões, 16 (40%) apresentavam alterações sugestivas da presença de HPV, quando observados ao microscópio óptico, e dessas, 8 expressavam proteínas estruturais do HPV (64). Sete anos mais tarde, o mesmo grupo examinou novamente as 40 biópsias usando a HIS e o PCR, tendo detetado a presença de DNA do HPV11, 16 e 18 em 12 das referidas amostras (62, 63).

Desde então, esta hipótese tem sido suportada por uma série de outros autores com base nas seguintes evidências: 1) o tropismo, bem identificado, do HPV para os tecidos epiteliais; 2) as semelhanças morfológicas entre o epitélio genital e orofaríngeo; 3) a capacidade do vírus imortalizar queratinócitos orais humanos *in vitro*; 4) o papel etiológico bem estabelecido do HPV de alto risco no carcinoma das células escamosas cervicais; 5) a deteção de genótipos de HPV de alto risco em amostras de carcinoma das células escamosas orais (65).

No que diz respeito à deteção de HPV em CCECP, Kreimer *et al* (66) estabeleceram uma prevalência mundial de 25,9%, ao passo que Termine *et al* (67) estimaram uma prevalência mundial de 34,5%.

1.2.2.1.1 HPV e cancro orofaríngeo

Uma revisão sistemática da literatura levada a cabo por Kreimer *et al*, em 2005, relata a deteção de DNA HPV em 35,6% dos 969 casos de cancro orofaríngeo, sendo o HPV 16 o

genótipo mais comum aparecendo associado a 87% dos casos HPV-positivos (66). Em 2007 D'Souza *et al* levaram a cabo um estudo caso-controlo em 100 pacientes recentemente diagnosticados com cancro orofaríngeo e 200 pacientes de controlo sem cancro, para avaliar a associação entre a infeção por HPV e o cancro orofaríngeo. Concluíram que a infeção por HPV oral está fortemente associada ao cancro orofaríngeo entre indivíduos consumidores ou não de álcool e tabaco (68). Dayyani *et al*, numa meta-análise realizada em 2010., apontam para uma prevalência de 41% em 925 pacientes com cancro orofaríngeo (69).

1.2.2.1.2 HPV e cancro não orofaríngeo

Kreimer *et al* relatam que 23, % dos cancros da cavidade oral e 24% dos cancros laríngeos são DNA HPV positivos (66). Syrjanen *et al* apontam para uma prevalência de DNA HPV quatro vezes maior em indivíduos com lesões orais pré-cancerosas (tais como leucoplasia oral, líquen plano e displasia oral) quando comparada com controles normais (5). Uma revisão sistemática da literatura realizada por Isayeva *et al* apresenta uma prevalência de DNA HPV de 29,6% em 9 publicações de 120 pacientes com carcinoma sinonasal e menciona a deteção de HPV 16 num conjunto de 8 estudos baseados em PCR que incluem 154 pacientes com carcinoma da nasofaringe (70). Relativamente às neoplasias salivares, Boland *et al* demonstraram a presença de DNA HPV de alto risco em 2 de 16 carcinomas adenoides quísticos (71).

Todavia, evidências moleculares de suporte - especificidade do DNA HPV para o núcleo celular do tumor, integração viral no genoma do hospedeiro, alta carga viral de HPV e expressão dos oncogenes de HPV - faltam na literatura. Considerando a suscetibilidade dos métodos baseados em PCR à contaminação, na ausência de dados acerca da funcionalidade do HPV nas células tumorais, o papel etiológico do HPV no cancro da cavidade oral e laríngeo ainda não se encontra esclarecido. O papel etiológico da infeção por HPV noutros cancros da cabeça e pescoço, nomeadamente dos cancros sinonasais e nasofaríngeos permanece também por clarificar (59).

Revela-se necessário realizar estudos moleculares e epidemiológicos adicionais no intuito de avaliar a associação da infeção por HPV com outros cancros da cabeça e pescoço, tais como o cancro da cavidade oral e da laringe (59).

1.2.2.1.3 Cancros orofaríngeos HPV-positivos

Os cancros HPV-positivos são tipos específicos de tumores com importantes diferenças relativamente aos cancros HPV-negativos, a nível de: tipologia de paciente de risco (geralmente homens solteiros com menos de 40 anos); estadiamento histológico (cancro bem diferenciado) e histotipo (aparência basalóide desnecessária mas possível, de crescimento rápido); resposta à quimioterapia, terapia alvo inovadora e/ou estratégias imunoestimuladoras; resultados clínicos em termos de sobrevivência (65).

Os CCECP HPV-positivos possuem melhor prognóstico que os CCECP HPV-negativos, apresentando uma maior sobrevivência, uma menor taxa de recorrência e uma melhor resposta à terapêutica (62). Isto poderá dever-se a três possíveis explicações: 1) o genoma das células cancerosas HPV-positivo é menos instável e/ou 2) as células HPV-positivas sofrem de hipóxia e podem ser mais facilmente induzidas a sofrer apoptose ou 3) o tratamento melhora a imunidade local favorecendo a erradicação do HPV e a regressão do tumor (72).

1.2.3 Cancro do pénis

A nível global, o cancro do pénis é raro, representando menos de 0,5% dos cancros nos homens (37).

Em cerca de 40-50% de todos os cancros do pénis deteta-se DNA-HPV, e estudos serológicos reiteram o papel do HPV 16 e 18 (37). *Bezerra et al* (73) encontraram DNA HPV em 30% de 71 casos de cancro peniano no Brasil, e *Rubin et al* (74) encontraram HPV em 42% de 148 casos nos Estados e Paraguai (37).

1.2.4 Cancro da vulva

A taxa de incidência padronizada por idade situa-se entre os 0.5 e 1.5 por 100,000 (37).

A maioria dos tumores localizados a nível da vulva são carcinomas das células escamosas. Contudo, verifica-se também o aparecimento de outros subtipos, nomeadamente do tipo basalóide e verrucóide, associados à infeção por HPV, e de lesões precursoras de neoplasia intraepitelial vulvar (NIV), e do tipo verrucoso, que não está (37).

Estudos que recorreram à técnica do PCR apontam para uma prevalência de HPV de 20-50% em cancros da vulva (75). Relativamente ao cancro do pénis e da vulva, *N. Muñoz et al.* estabeleceram uma prevalência de 60-90% de HPV nos tumores diagnosticados em

indivíduos jovens, geralmente do tipo basalóide ou warty, e de menos de 10% em indivíduos velhos, mais associados a CCE queratinizantes (14).

1.2.5 Cancro da vagina

A taxa de incidência padronizada por idade é de 0.3-0.7 por 100,000 na maioria dos países (37).

Grande parte dos CCE é precedida por neoplasia intraepitelial vaginal (NIVA). O carcinoma das células claras da vagina é uma complicação da exposição ao dietilestilboestrol no útero; a malignização ginecológica simultânea ou anterior aumenta o risco, sobretudo se associada a irradiação pélvica (37).

A prevalência de HPV em câncros vaginais é cerca de 60-65% (75), e 64-91% segundo N. Muñoz *et al* (14, 37).

1.2.6 Cancro do ânus

No ânus surgem predominantemente CCE, adenocarcinomas, ou carcinomas basalóides e cloacogénicos. O CCE é duas vezes mais prevalente nas mulheres do que nos homens, na grande maioria das populações. No entanto, verificam-se em algumas populações taxas de incidência elevadas nos homens devido à alta incidência em indivíduos homossexuais do sexo masculino, sendo este risco exponenciado pela infeção com HIV. Tabaco, sexo anal, e número de parceiros sexuais aumentam o risco de cancro do ânus (37).

N. Muñoz *et al* determinaram uma prevalência de DNA-HPV de 88-94% nos câncros anais (14). Frisch *et al.* analisaram 386 casos de cancro anal da Dinamarca e Suécia, tendo detetado HPV oncogénico em 95% e 83% das mulheres e homens respectivamente (76).

1.2.7 Cancro da pele

Os tipos de HPV associados a epidermodisplasia verruciforme (EV) estão potencialmente envolvidos no desenvolvimento de cancro da pele não-melanoma (CPNM) que inclui o CCE e o carcinoma das células basais (14). Tem sido detetado DNA-HPV em 30-50% dos CPNMs em populações imunocompetentes e em 90% dos recipientes de transplantes de órgãos imunossuprimidos (77).

Segundo a avaliação realizada em 2005 pela Agência Internacional de Investigação sobre Cancro (IARC) acerca da carcinogenicidade do HPV em humanos, existem

evidências suficientes da relação entre HPVs associados a EV e cancro de pele das células escamosas em pacientes com EV, e entre HPV e carcinomas das células escamosas periunguais. As evidências da relação entre HPVs associados a EV e cancro das células escamosas são contudo limitadas (14).

Apesar da luz UV ser o agente etiológico primário no CPNM, tem vindo a tornar-se cada vez mais claro que os tipos de HPV associados a EV, sobretudo o HPV 5 e 8, podem agir como co-carcinógenos a par com a radiação UV ou imunossupressão no desenvolvimento de CPNM (14).

1.2.8 Cancro da conjuntiva

DNA-HPV tem sido detetado em condições benignas da conjuntiva, assim como na displasia, carcinoma *in situ*, e carcinoma invasivo. Expressão genética do E6 de HPV-16 e 18 foi demonstrada em neoplasia intraepitelial da conjuntiva (14).

De acordo com a avaliação de 2005 da IARC, as evidências da carcinogenicidade do HPV na conjuntiva são limitadas (14).

1.2.9 Cancro da mama

O cancro da mama é uma das malignidades mais prevalentes a nível mundial, sendo o tipo de cancro líder na população feminina (78).

A sua etiologia é desconhecida. Existem, no entanto, muitos fatores de risco associados ao seu desenvolvimento: genéticos, endócrinos, ambientais, e relacionados com o estilo de vida. Mais recentemente surgiram evidências da associação entre a carcinogénese do cancro da mama e agentes virais. Suspeita-se de um possível papel do HPV oncogénico no cancro da mama. Tem sido demonstrado que células epiteliais humanas da mama podem ser imortalizadas pelos tipos HPV 16 e 18 *in vitro*. Este fato levantou a possibilidade de que o HPV poderá eventualmente estar relacionado com a etiologia de alguns casos de cancro da mama. Contudo, o papel causal da infeção por HPV no desenvolvimento do carcinoma da mama continua a estar envolto em grande controvérsia. Os estudos são contraditórios. Enquanto alguns relatam a presença de sequências de DNA-HPV em tecido de cancro da mama, sobretudo dos tipos 16, 18 e 33, outros afirmam que não detetaram qualquer tipo de HPV em casos de cancro da mama (79).

Di Lonard *et al* (1992) (80) foram os primeiros a relatar a associação entre HPV e cancro da mama, demonstrando a presença de DNA de HPV 16 em 29,4% de carcinomas

da mama. Um estudo norueguês detetou HPV em 46% dos carcinomas da mama (81). Outro estudo europeu revelou a presença de HPVs de alto risco em 15% dos carcinomas invasivos da mama, na Grécia (82). Na Coreia, um estudo relatou a presença de DNA-HPV em 6,5% em carcinomas da mama mas não em papilomas intraductais (83). No Brasil, foi demonstrada por um estudo, a presença de HPV 16 e 18 em 14 e 10% dos carcinomas da mama, respetivamente (84). Um estudo australiano relatou a presença de HPV 18 em 48% dos espécimes de cancro da mama (85). Na China e no Japão foi detetada a presença de HPV 33 em 41,7% e 11, 1% dos carcinomas da mama nos dois países, respetivamente (86). De Villiers *et al* (2005) (87) relataram a presença de HPVs de alto e baixo risco em 86% dos espécimes de cancro da mama e mamilos. Em contraste, uma série de outros estudos não conseguiram detetar DNA-HPV em tumores da mama (88, 89).

1.3 Vacinas contra o HPV

Como foi dito anteriormente, no caso do cancro do colo do útero existem medidas preventivas que passam pela vacinação. As vacinas preventivas visam impedir a entrada de HPV nas células epiteliais ao passo que as vacinas terapêuticas permitem gerar uma resposta imune mediada por células T a fim de eliminar infeções por HPV existentes ou neoplasmas associados a HPV (3).

1.3.1 Vacinas preventivas

1.3.1.1 Vacinas contra o cancro do colo do útero

A perceção da estreita ligação entre a infeção por HPV e o cancro cervical levou ao desenvolvimento de vacinas contra o HPV (58). A produção de HPVs inativos não é possível *in vitro* dado os vírus não puderem ser cultivados em culturas de células contínuas. Desta forma, as vacinas direcionadas contra o HPV baseiam-se em partículas semelhantes a vírus (*Virus Like Particles* ou VLPs), produzidas através da expressão da proteína principal da cápside do HPV L1, uma proteína da cápside principal do HPV, usando tecnologia de DNA recombinante em células de leveduras ou insectos. As VLPs assemelham-se fisicamente à superfície do vírus e são capazes de induzir respostas serológicas reativas com partículas virais infecciosas porque mantêm a estrutura do vírus nativo. Contudo, não são infecciosas visto não conterem informação genética (90).

A abordagem da vacina profilática tornou-se possível em 1991, após Zhou *et al* terem demonstrado que as proteínas L1 da cápside do HPV 16 se organizam conformacionalmente em partículas com semelhanças estruturais aos viriões nativos (VLPs) (91).

Existem duas vacinas disponíveis comercialmente: a Gardasil e a Cervarix. A Gardasil (HPV4) é uma vacina HPV L1 VLP quadrivalente que contém L1 VLP derivado do HPV-6, 11, 16 e 18 (39, 58). Esta vacina foi licenciada em 2006 para uso exclusivo em mulheres dos nove aos vinte seis anos para a prevenção do cancro cervical, vaginal e vulvar. Em 2009, nos Estados Unidos, a sua licença foi alargada no sentido de incluir também homens dentro da mesma faixa etária, visto ter sido provada a sua eficácia na prevenção de verrugas genitais em ambos os sexos. Investigações recentes têm demonstrado que a Gardasil é também eficaz na prevenção de cancro anal. Ensaios clínicos apresentam uma eficácia clínica de mais de 98% na prevenção de pré-cancros vulvares, vaginais, cervicais e anais em indivíduos não infetados com as estirpes de HPV contra as quais a vacina protege. A sua eficácia em indivíduos já infetados com estas estirpes é de 50 a 78% (40). A Cervarix (HPV2) contém L1 VLP derivado do HPV-16 e 18, oferecendo também proteção cruzada parcial contra o HPV 31 e 45, apesar de não estarem incluídos na vacina (58). Esta vacina foi licenciada em 2009 para a prevenção contra o cancro cervical. Possui uma eficácia de mais de 97% em indivíduos não infetados com as estirpes contra as quais protege e uma menor eficácia em indivíduos não infetados. Apesar de não terem sido realizados até à data, ensaios clínicos que comprovem a sua eficácia na prevenção contra cancros e pré-cancros anais, vulvares e vaginais, dada a sua semelhança estrutural com a Gardasil, há razões para acreditar que será eficaz na prevenção de cancros anogenitais associados ao HPV 16 e 18 (40).

Vários ensaios clínicos têm provado que ambas as vacinas demonstram respostas imunológicas notáveis, com quase 100% de eficácia num máximo de 5 anos em mulheres que nunca tiveram contato com as estirpes contra as quais a vacina protege (92-96).

A eficácia clínica a longo prazo é suportada pelos resultados de um estudo de corte em mulheres vacinadas com um precursor monovalente (HPV-16) da HPV4 que demonstra uma elevada eficácia durante mais de 8.4 anos (97, 98). A vacina bivalente apresenta uma eficácia clínica elevada durante mais de 6.4 anos (98).

1.3.1.2 Vacinas contra o cancro da cabeça e pescoço

Atualmente, a investigação científica procura descobrir a relação entre HPV e malignidades orais e genitais, considerando as semelhanças ultraestruturais e morfológicas existentes entre o epitélio vaginal e oral (65). Postma e Van Heerdan observaram uma associação entre o carcinoma cervical e oral, sugerindo que a infeção por HPV transmitida oro-genitalmente pode induzir a transformação neoplásica sincro ou assincronamente, em diferentes mucosas (99).

Dado que o número de cancros orofaríngeos associados à infeção por HPV tem vindo a aumentar nos países ocidentais, o objectivo a longo prazo deverá ser o de reduzir a sua incidência em mulheres vacinadas. Posteriormente, a vacinação poderá ser alargada aos homens, como já se verifica em determinados países não só a fim de reduzir a incidência de infeções e cancros genitais masculinas associados a HPV, como também de infeções e cancros da cabeça e pescoço se se provar a eficácia da vacina na prevenção da infeção orofaríngea(60).

1.3.2 Vacinas terapêuticas

Encontram-se em desenvolvimento uma série de vacinas terapêuticas que têm como alvo tumores das regiões anogenitais e da cabeça e pescoço mediados por HPV 16. O seu objetivo é apresentar proteínas fusão que contenham E6 ou E7, ou ambos, ao sistema imunitário de modo a estimular uma resposta imunológica duradoura e eficiente, capaz de benefícios terapêuticos num contexto primário ou adjuvante. Todavia, um dos desafios será ultrapassar os mecanismos imunitários de escape que o HPV desenvolveu ao alvejar as células de Langerhans situadas em locais epiteliais do cérvix e orofaringe em risco, e ao coordenar a apresentação de antígenos (56).

As vacinas em desenvolvimento incluem vacinas com o vetor vivo, vacinas baseadas em péptido/proteína, vacinas baseadas em células e vacinas baseadas em ácidos nucleicos (3).

OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

O objetivo deste estudo é aferir a prevalência da infecção pelo vírus HPV, nomeadamente dos tipos 6, 11, 16 e 18, em amostras de saliva de pacientes da Clínica Dentária Universitária UCP-Viseu .

METODOLOGIA

3. METODOLOGIA

3.1 Tipo de estudo

Foi efetuado um estudo epidemiológico observacional transversal com a finalidade de determinar a prevalência dos vírus HPV (especificamente dos tipos HPV 6, 11, 16 e 18) na saliva dos pacientes da Clínica Dentária Universitária UCP-Viseu.

3.2 Amostra

A amostra de conveniência é constituída por 40 pacientes que recorreram à Clínica Dentária Universitária entre Fevereiro e Junho de 2012. Os pacientes são de ambos os sexos, e têm entre 18 a 74 anos.

3.3 Recolha de dados

As amostras de saliva e epitélio dos bordos laterais da língua foram recolhidas por solicitação ao paciente que colecionasse saliva na boca durante alguns minutos. Esta saliva foi recolhida em tubos de 1,5 ml e imediatamente congelada. Foi também recolhido um esfregaço do epitélio oral com uma zaragatoa. A todas as amostras foi associada a idade e o sexo do dador da saliva. As amostras foram imediatamente congeladas até à análise laboratorial e sujeitas posteriormente a análises de PCR para a identificação da presença de HPV 6, 11, 16 e 18. Todos os pacientes participaram neste estudo voluntariamente e assinaram uma declaração de consentimento informado que se encontra em anexo.

3.4 Protocolo

Numa primeira instância foi dada ao paciente uma breve explicação sobre a forma como se iria processar a recolha das amostras, e o motivo pelo qual ela estava a ser efetuada. Seguidamente, o paciente procedeu ao preenchimento do consentimento informado. Finalmente procedeu-se à recolha da amostra. O paciente foi instruído para acumular saliva na sua boca e depois expeli-la para um copo. Essa saliva foi posteriormente pipetada para um tubo *Eppendorf* em condições de assépsia. Adicionalmente foram usadas zaragatoas

estéreis para recolher epitélio oral por raspagem do bordo da língua. As amostras foram identificadas e imediatamente congeladas a -20°C para posterior análise.

3.5 Análise laboratorial

Das amostras de saliva recolhidas foi isolado o DNA que depois foi sujeito a reações de PCR com *primers* específicos para a infeção por HPV. As amostras positivas foram ainda sujeitas à tipificação do vírus presente por sequenciação dos amplificadores obtidos. Estes procedimentos foram realizados globalmente de duas formas diferentes: numa primeira fase o isolamento de DNA e a amplificação do mesmo com *primers* genéricos para HPV foi feita nos laboratórios da UCP com os seguintes protocolos:

3.5.1 – Protocolo de extração de DNA fenol clorofórmio

- Centrifugar o tubo *Eppendorf* com a saliva a 2925 xg (2700rpm) durante 15 minutos
- Descartar o sobrenadante e lavar o *pellet* com 35 μl de tampão TE (10mM Tris e 10mM EDTA a pH 8,0)
- Centrifugar novamente a 2925xg (2700rpm) durante 15 minutos e descartar o sobrenadante
- Ressuspender o *pellet* com tampão de lise (10mM Tris, 10mM EDTA, 0,1mM NaCl e 2% SDS tudo a pH 8,0). Adicionar 35 μl de proteinase K a 20mg/ml
- Colocar na incubadora a 58°C durante 2 horas
- Adicionar 700 μl de clorofórmio e agitar no agitador vortex durante 10 segundos
- Centrifugar a 15167xg (1400rpm) durante 2 minutos e adicionar 70 μl de NaOAc (pH 6,0) e 140 μl de etanol frio 70%
- Centrifugar novamente a 15167 (1400rpm) durante 2 minutos e aspirar o sobrenadante
- Deixar o *pellet* secar durante pelo menos 2 horas e ressuspender em 500 μl de tampão TE

3.5.2 – Protocolo de PCR usado na amplificação do DNA com *primers* gerais para HPV

O *Master Mix* era constituído por 12 μl de água deionizada estéril, 2,5 μl de tampão, 0,5 μl de dNTP's, 0,75 μl de MgCl, 1 μl de *primer* IL-889 F, 1 μl de *primer* IL-889 R, 1 μl de

primer MY09 R e finalmente 1µl de *primer* MY11 F. Isto resulta num volume final de 20µl de *Master Mix* por reação. Multiplica-se pelo número de reações que se pretende e em cada tubo de reação adicionamos 20µl mais 5µl de amostra.

Usou-se também um controlo negativo, 205µl de *Master Mix* mais 55µl de água.

As condições do termociclador foram as seguintes: primeiro passo a 95°C durante 2 minutos; segundo passo a 95°C durante 30 segundos; terceiro passo a 50°C durante 30 segundos; quarto passo a 72°C durante 1 minuto; repetir o segundo, terceiro e quarto passos durante 40 ciclos.

Finalmente a extensão a 72°C durante 10 minutos

Uma vez que os resultados obtidos nesta primeira fase não foram satisfatórios optou-se por encomendar a análise de novas amostras a um laboratório externo (a Infogene) com extensa experiência na análise molecular da presença e tipificação de HPV em amostras de muco cervical. Neste laboratório foi feito o isolamento de DNA de 40 amostras com a utilização de um kit comercial específico para o isolamento de DNA viral *InviMag® Virus DNA Mini Kit*. Este *kit* usa partículas magnéticas permitindo um isolamento de DNA muito eficiente de elevada pureza. A quantificação e pureza do DNA obtido na extração quer nos laboratórios do CRB (pelo método fenol/clorofórmio) quer pela Infogene com o *kit* de extração foi feita por espectofotometria. a 230, 260 e 280 nm no equipamento NanoDrop.

A qualidade do DNA foi avaliada por PCR através da amplificação de um fragmento de aproximadamente 624 pb do gene da beta-actina humana (ACTB) que funcionou como controlo positivo para a presença de DNA amplificável nas amostras.. Nos casos negativos, o PCR foi repetido nas mesmas condições, mas com o uso de novo conjunto de *primers* que amplificam um fragmento de aproximadamente 353 pb do gene BRCA2. A revelação dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% em TAE, com *GelStar DNA-stain* a 3%.

Os parâmetros térmicos para os PCRs de avaliação da qualidade do DNA foram: desnaturação inicial a 95°C - 4 min, seguido de 45 ciclos a 94°C - 30 seg, 56°C - 30 seg, e 72°C - 60 seg, e por fim extensão final a 72°C - 5 min.

Nas amostras processadas na Infogene foi testada a presença de DNA de HPVs mucosotrópicos por PCR, utilizando dois sistemas de *primers* gerais (MY09/MY11 e GP5+/GP6+), validados e publicados para a amplificação de fragmentos de consenso do gene L1 do genoma do vírus (22, 23)

A revelação dos produtos amplificados foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 2% (em TAE, com *GelStar DNA-stain* a 3%). Subsequentemente, todas as amostras que

apresentavam fragmentos de amplificação foram avaliadas por sequenciação para esclarecer em absoluto a presença ou ausência de DNA de HPVs.

Usando os resultados da sequenciação de Sanger foram procurados os alinhamentos com a ferramenta blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) entre esses resultados e as sequências de HPV depositadas no GeneBank. Foram também produzidas imagens desses alinhamentos usando as referidas ferramentas.

3.6 Variáveis em estudo

As variáveis deste estudo são a idade e o sexo. As idades dos indivíduos que constituíram a amostra variam entre os 18 e os 74 anos. Quanto ao gênero, a amostra abrange indivíduos do sexo masculino e feminino.

3.7 Procedimentos legais e éticos

Os procedimentos legais e éticos foram garantidos pelo preenchimento do consentimento informado pelo paciente, previamente à recolha das amostra de saliva e epitélio.

RESULTADOS

4.RESULTADOS

As amostras de saliva e epitélio recolhidas correspondem a um grupo de indivíduos cuja idade e sexos se distribuem de acordo como descrito no gráfico 1.

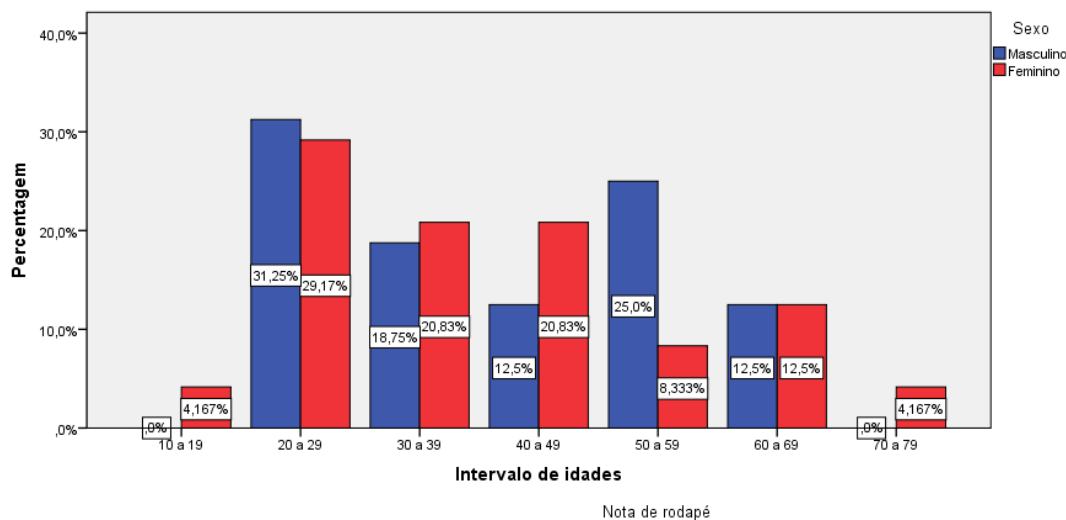


Gráfico 1 Distribuição de sexos e faixas etárias

Nos anexos B e C são apresentados os resultados dos testes de pureza e concentração do DNA nas amostras. Estes parâmetros foram determinados por análise espectofotométrica em amostras cujo DNA foi isolado pelo método de extração clorofórmio/fenol e com um *kit* em que são usadas partículas magnéticas respetivamente. .

Os resultados da verificação da adequação do DNA obtido para amplificação por PCR são apresentados nas figuras 3 e 4 em que é possível verificar a amplificação do gene beta-actina humana (ACTB) na maioria das amostras. Para as amostras em que não houve amplificação do beta-actina humana (ACTB) foi realizada nova reação de PCR com *primers* para um fragmento de aproximadamente 353 pb do gene BRCA2 (figura 5,6 e 7)

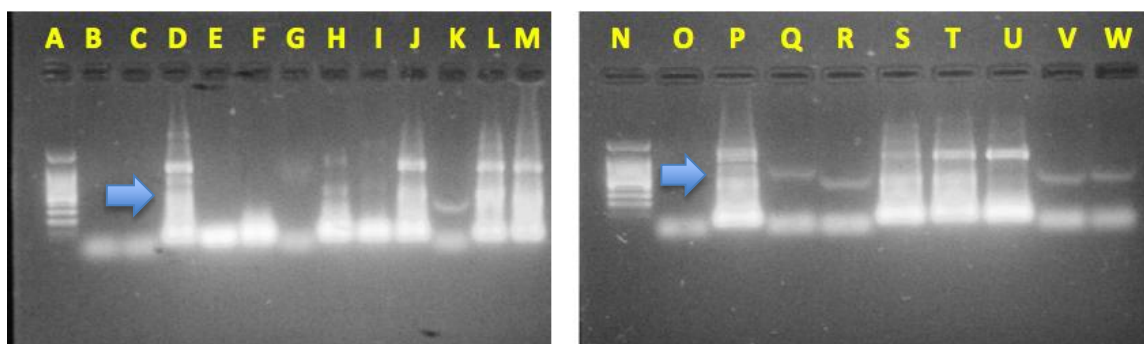


Figura 3 Gel para fragmentos do gene da beta-actina humana (amostras 1 a 21). Legenda: Poço A – 100bp *ladder*; Poços B a M – Amostras 1 a 12; Poço N – 100bp *ladder*, Poços O a W – Amostras 13 a 21. A seta azul marca o alinhamento do fragmento da beta-actina humana.

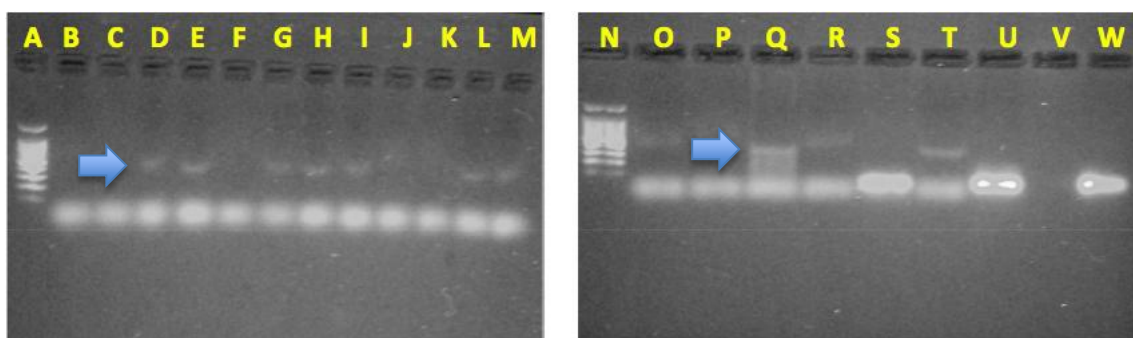


Figura 4 Gel para fragmentos do gene da beta-actina humana (amostras 22 a 40). Legenda: Poço A – 100bp *ladder*; Poços B a M – Amostras 22 a 33; Poço N – 100bp *ladder*; Poços O a U – Amostras 34 a 40; Poço V – vazio; Poço W – Controlo negativo. A seta azul marca o alinhamento do fragmento da beta-actina humana.

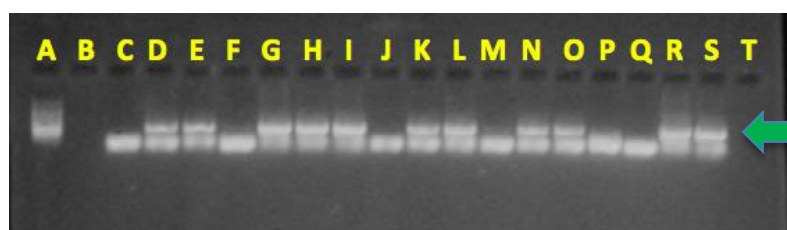


Figura 5 Gel para fragmento do gene da BRCA2 (amostras negativas para beta-actina). Legenda: Poço A – 100bp *ladder*; Poço B – Vazio; Poço C – Amostras 1; Poço D – Amostra 2; Poço E – Amostra 4; Poço F – Amostra 6; Poço G – Amostra 8; Poço H – Amostra 13; Poço I – Amostra 22; Poço J – Amostra 23; Poço K – Amostra 26; Poço L – Amostra 30; Poço M – Amostra 31; Poço N – Amostra 35; Poço O – Amostra 38; Poço P – Amostra 40; Poço Q – Controlo Negativo; Poço R – Controlo Positivo (Citologia HPV+); Poço S – Controlo Positivo (Amostra 3); Poço T – Vazio. A seta verde marca o alinhamento do fragmento da proteína BRAC2.

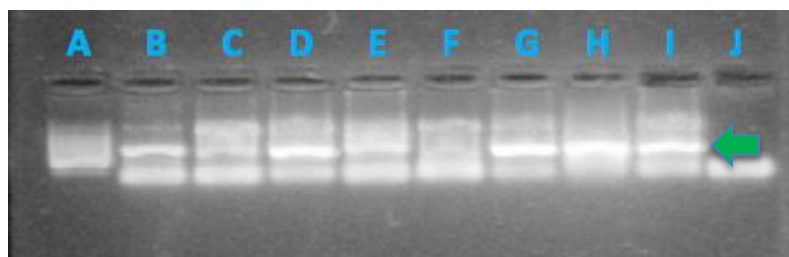


Figura 6 Gel 2 para fragmento do gene da BRCA2 (repetição de amostras c/ 2x DNA).
 Legenda: Poço A – 100bp *ladder*; Poço B – Amostra 1; Poço C – Amostra 6; Poço D – Amostra 23; Poço E – Amostra 31; Poço F – Amostra 40; Poço G- Controlo Positivo (Citologia HPV+); Poço H – Contr. β Actina positivo (Amostra 3); Poço I – Contr. BRCA2 positivo (Amostra 35); Poço J – Controlo negativo. A seta verde marca o alinhamento do fragmento BRAC2.

Na figura 7 são apresentados os resultados da pesquisa de DNA viral com os *primers* genéricos de HPV MY09/MY11. É evidente nesta imagem a presença de várias amostras positivas o que indica a possível presença de infeção por HPV.

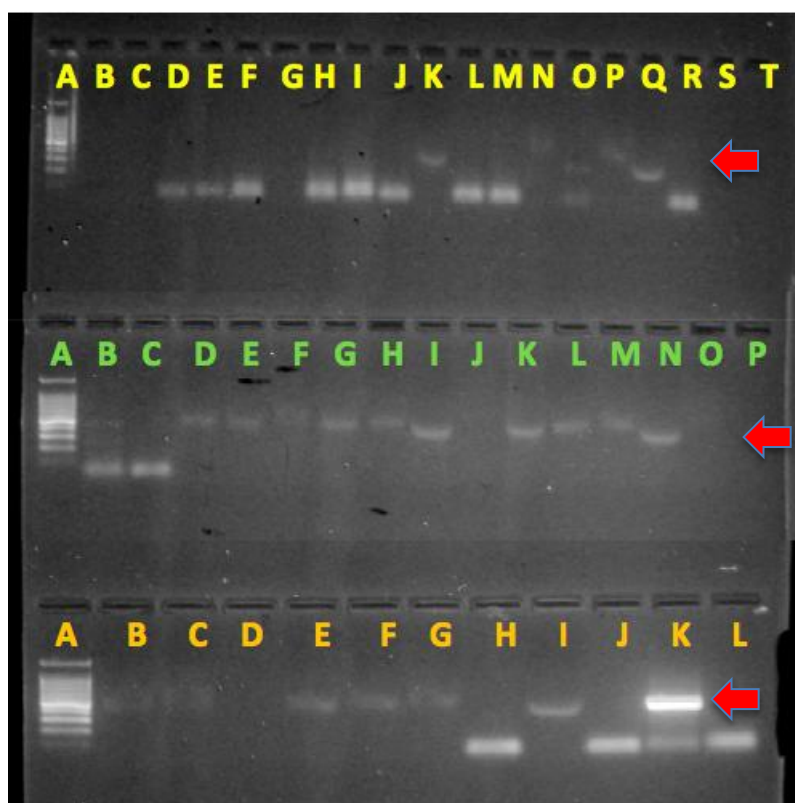


Figura 7 Gel para fragmentos MY09/MY11 do gene L1 do genoma do vírus. Legenda Vazios. Legenda Série Verde: Poço a – 100bp *ladder*; Poços B a O – Amostras 18 a 31; Poço P – Vazio. Legenda Série Laranja: Poço A – 100bp *ladder*; Poços B a J – Amostras 32 a 40; Poço K – Controlo positivo; Poço L – Controlo negativo. A seta vermelha marca o alinhamento do fragmento de L1 amplificado com os primers MY09/MY11.

Nas amostras em que não foi possível amplificar DNA de HPV com os *primers* MY09/MY11, usaram-se os *primers* GP5+/GP6 para verificar se era possível amplificar DNA viral (figura 9 e 10). Nesta figura pode verificar-se que algumas amostras revelam sinais de amplificação.



Figura 8 Gel 1 para fragmentos GP5+/GP6+ do gene L1 do genoma do vírus. Legenda Série Branca: Poço A – 100bp *ladder*; Poço B – Vazio; Poços C a S – Amostras 1a 17; Poço T – Vazio. Legenda Série Laranja: Poço A – 100bp *ladder*; Poços B a O – Amostras 18 a 31; Poço P – Vazio. Legenda Série Azul: Poço A – 100bp *ladder*; Poços B a J – Amostras 32 a 40; Poço K – Controlo negativo; Poço L – Controlo positivo. A seta laranja marca o alinhamento do fragmento de L1 amplificado com os primers GP5+/GP6+.

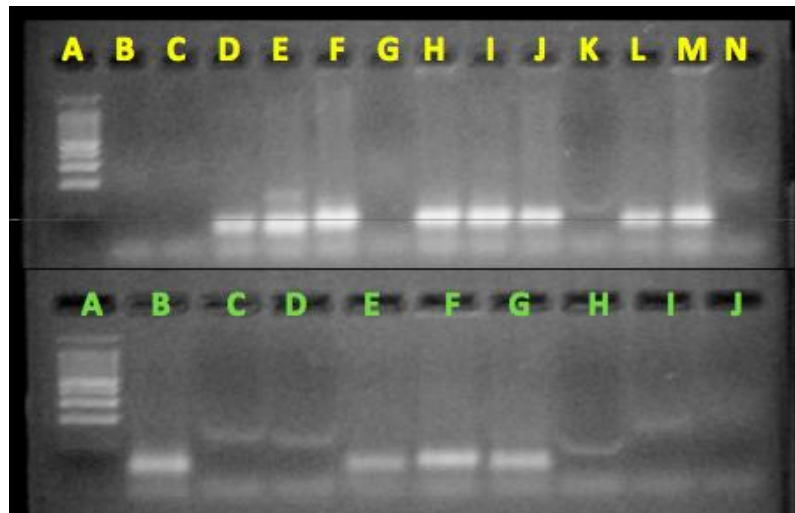


Figura 9 Gel 2 para fragmentos GP5+/GP6+ do gene L1 do genoma do vírus (recast da primeira linha do gel 1). Legenda Série Amarela: Poço A – 100bp *ladder*; Poços B a N – Amostras 1 a 13. Legenda Série Verde: Poço A – 100bp *ladder*; Poços B a J – Amostras 14 a 22. A seta laranja marca o alinhamento do fragmento de L1 amplificado com os primers GP5+/GP6+.

Assim da análise das figuras anteriores foi possível determinar que nas amostras 2 a 5, 7 a 9, 11 a 13, 16 a 18, 30 e 40 há suspeita de haver infecção por HPV. Para determinar exatamente qual o tipo de HPV presente foi feita a sequenciação do DNA obtido nas amplificações. As várias sequências obtidas foram comparadas com as sequências de HPV depositadas na base de dados GeneBank usando o algoritmo blastn. Nenhuma das sequências obtidas nas amostras da CDU produziu um alinhamento com semelhanças significativas com as sequências depositadas para HPV. Na figura 10 são apresentados os resultados do alinhamento de uma das sequências provenientes das amostras da CDU e uma sequência específica de HPV e é possível verificar extensas zonas de não correspondência das bases. Desta análise verificou-se que as sequências obtidas não eram específicas de HPV pelo que não se confirma a infecção em nenhuma das 40 amostras analisadas.

```

M14      AMXWrv-abABINTATNGNNGTNNNATGAGACATGACTCTCCTGACGCTGCTCGGATG
G23      -----CGXDrv
G95      -----EGXDrv
          *                               *

M14      CAGTTCTGCCTGCCAACGCCTTTTCTTCCCTGCTCTTTCTCTGAACCTGGCTTGCCCCTT
G23      -abABINNNNNNNNNNNNTTNTTCCATCNTCCCTTCGTTGGGGCTATAAT-----
G95      -abABINN-----NNNNNNNNANATTCCTTAACTTTGTGGGGTCATATT-----
          : .                               . . . : * * . * * * . * .
          : .                               . . . : * * . * * * . * .

M14      CTTAACTGCANAAAAACGGTTTGGCACGCCTTAAATCCTTCTGGACTTACCACTTCGGGG
G23      -----CT--GNCTGTTATCTTGAGATATCTCGG
G95      -----CAGTGGTTGTTTGGGTGGCAG-----
          . : * * * * . *

M14      ATTCATTTAGGTTAAAGGTGATACCTATGATAACTGCGGGATGACCATTATTATAACCCT
G23      GAGAAAANNACNNCAGACGTGCTCGTGTGA---ATA-----TCCAAAAG-----
G95      ---CACTAATAGTAAAATTGGTACTGCGAGTAGTA-----TCTACCACAGTNNATTCCA
          . * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

M14      GTGCGN
G23      -----
G95      -----

```

Figura 10 Resultado de um alinhamento típico entre uma amostras de HPV (E03_G95) e os fragmento obtidos para as amostras M14 e G23.

DISCUSSÃO

5.DISCUSSÃO

O cancro é a segunda maior causa de morte em Portugal, e o cancro da cabeça e pescoço representa cerca de 10% de todos os cancros malignos(100). A etiologia do carcinoma das células escamosas da cabeça e pescoço é multifatorial. O HPV oncogénico, um agente causal do cancro cervical, tem sido repetidamente detetado em CCECP(101). Desta forma, revela-se pertinente quantificar a prevalência de HPV oral na população portuguesa não só para determinar a prevalência do vírus nesta população como também para fazer a tipificação dos vírus presentes.

O principal objetivo deste estudo foi proceder a um rastreio oral da população da Clínica Dentária Universitária UCP-Viseu, no que diz respeito à presença de HPV nos seus pacientes.

Os métodos não invasivos de recolha de saliva e epitélio oral dos bordos laterais da língua utilizados incentivaram a boa adesão dos pacientes a esta análise. Os resultados deste estudo fornecem novos dados acerca de uma população de pacientes e uma área geográfica ainda não submetida a qualquer tipo de rastreio, no intuito de construir bases de dados relativas à prevalência de HPV oral em Portugal.

Os dados recolhidos demonstraram uma prevalência de HPV oral de 0% num grupo de 40 pacientes de idades compreendidas entre os 18 e os 74. Estes resultados apesar de um pouco abaixo da prevalência encontrada noutros estudos que referem uma prevalência de 4,5% em 4070 adultos saudáveis (29), de 6,9% em 5579 americanos (102), assim como com uma prevalência de 2,6% de HPV em 151 pacientes adultos saudáveis da Clínica Dentária Universitária da Universidade do Nevada (103). Existem outros estudos que referem prevalências mais elevadas (104, 105) de HPV em saliva e/ou mucosa oral de indivíduos saudáveis, no entanto salientamos que a aparente discrepância entre os nossos resultados e os resultados publicados poderá ser atribuída à forma de deteção. Assim, devemos considerar que, se a análise por nós efectuada, tivesse parado aquando da amplificação de um fragmento de DNA, do conjunto das figuras 7 a 9 previa-se que houvesse 10 amostras ou seja 25% de amostras positivas para a presença de HPV. É nesta fase da análise que ficaram alguns dos estudos em que foram detetadas prevalências mais elevadas (105). No entanto a sequenciação permitiu mostrar que apesar de haver amplificação de um fragmento semelhante em tamanho ao esperado para HPV, a sequência era diferente e a presença do vírus não era confirmada. Noutro dos estudos em que se pode estabelecer alguma comparação, a confirmação de que os fragmentos obtidos por

amplificação por PCR correspondem a HPV foi feita por sondas molecular e desta forma a detecção depende da hibridização em zonas que podem ser comuns mas que não correspondem à totalidade da sequência (referência suécia). Assim, torna-se evidente que quando se quer comparar resultados de prevalência de HPV, além de considerar factores relacionados com cada população (risco de infeção por HPV) será também necessário ter em atenção os métodos de colheita e análise usados em cada estudo pois podem fazer variar em grande medida os resultados.

Acresce ainda o fato do HPV 16, um dos tipos de HPV abrangidos nesta análise, ser uma das infeções sexualmente transmissíveis mais vulgarmente detetadas na região anogenital, no entanto, é relativamente raro na região oral, fato apoiado pelos resultados deste estudo. A razão pela qual isto se verifica é desconhecida, especialmente considerando as semelhanças entre os epitélios das mucosas da região anogenital e oral. Tal poderá ser parcialmente explicado pelas diferenças na recolha dos espécimes. Os espécimes orais são recolhidos em largos volumes, nomeadamente via bocheco, diluindo desta forma o DNA HPV, o que poderá ser agravado pela baixa carga viral nos espécimes orais, apesar do uso de ensaios baseados em PCR sensível na deteção de HPV oral. Há descrição de estudos em que a quantidade de material recolhido foi insuficiente em quase 10% das amostras (104). Alternativamente, a explicação para estas baixas prevalências do vírus podem também resultar de uma exposição menor da mucosa oral ao vírus. ou de uma maior resistência da região oral a este tipo de infeção(30).

Este estudo teve um carácter preliminar para aferição das técnicas de colheita e análise pelo que é útil deixar recomendações para estudos futuros. Assim deverão ser, tanto quanto possível, recolhidas amostras de maiores dimensões aumentando a representatividade da amostra em relação à população em estudo. Também o volume de saliva deve ser aumentado para 10 ml e a amostra deve ser sempre suplementada com o esfregaço do bordo da língua. Esta medida permite um aumento da quantidade de células colhidas e portanto a recuperação do material genético. Salientamos ainda que só é possível fazer a relação da presença de HPV com lesões da cavidade oral com a observação da mesma. Assim, estudos em que além da presença e tipagem do HPV nos tecidos orais, possam ser colhidos dados demográficos relativos ao risco de infeção (hábitos tabágicos, alcoólicos, vacinação, praticas sexuais, entre outros) e possa ser feita a observação clinica da cavidade oral, será possível responder a outro tipo de questões como a associação entre o vírus e os sinais clínicos.

CONCLUSÃO

6.CONCLUSÃO

Este estudo é importante do ponto de vista epidemiológico, porque permitiu caracterizar uma população ainda não rastreada quanto à prevalência de HPV oral. A averiguação e reunião deste tipo de dados epidemiológicos é de extrema relevância em termos de saúde pública, pois permite adequar as medidas preventivas às características específicas da população, nomeadamente no que diz respeito à criação de vacinas preventivas. Atualmente já existem vacinas contra os tipos HPV 6, 11, 16 e 18 desenvolvidas com o intuito de proteger contra as verrugas genitais e o cancro do colo do útero mas questiona-se a sua aplicabilidade na prevenção do cancro orofaríngeo tendo em conta que o HPV é a sua causa major em países desenvolvidos, sendo detetado em 45-90% dos casos (40). Considerando o aumento do número de casos deste tipo de cancro revela-se premente a necessidade de mais estudos epidemiológicos que investiguem a prevalência de HPV oral segundo o género, e as taxas de incidência e persistência de HPV oral, com o intuito de compreender a história natural do HPV oral e avaliar os benefícios que as vacinas existentes possam trazer à população se a sua eficácia na prevenção do cancro orofaríngeo for comprovada (29). Como estudo preliminar foi possível concluir a prevalência da presença de HPV na cavidade oral da população que frequenta a CDU é baixa uma vez que numa amostra de 40 pacientes não houve casos positivos. No entanto não se pode descartar a possibilidade de a amostra não ser representativa da população, sendo que para passar de resultados preliminares a resultados mais definitivos novos estudos devem ser realizados com um maior número de amostras analisadas.

BIBLIOGRAFIA

7.BIBLIOGRAFIA

1. Kumaraswamy K.L. VM. Human papilloma virus and oral infections: An update. *Journal of cancer research and therapeutics* 2011;7(2).
2. R S. HPV Vaccine: A breakthrough in prevention of cervical cancer. *Apollo medicine*. 2012.
3. Lin K DK, Hung CF, Wu TC. Perspectives for preventive and therapeutic HPV vaccines. *J Formos Med Assoc*. 2010;109(1):4-24.
4. Galván SC M-SM, Galván VM, Méndez R, Díaz-Contreras GT, Alvarado-Hermida M, Alcántara-Silva R, García-Carrancá A. Analysis of CpG methylation sites and CGI among human papillomavirus DNA genomes. *BMC Genomics*. 2011;12:580.
5. Syrjanen S. LG, von Bultzingslowen I., Aliko a., Arduino P., Campisi G., Challacombe S., Ficarra G., Flaitz C., Zhou H.M., Maeda H., Miller C., Jontell M. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral Diseases*. 2011;17(Suppl. I):58-72.
6. Souto Rafael FJIPB, da Cruz Aparecido Divino. O Papilomavírus Humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2005;51(2):155-60.
7. Bosch F. Xavier QY-L, Castellsagué Xavier. The epidemiology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*. 2006;94(1):S8-S21.
8. Martinelli M ZA, Bianchi S, Frati E, Colzani D, Amendola A, Tanzi E. Human papillomavirus (HPV) infection and genotype frequency in the oral mucosa of newborns in Milan, Italy. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(6):E197-9.
9. Michl P. PJ, Prochazka M., Pink R., Stosova T. Human papillomavirus in the etiology of head and neck carcinomas. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010;154(1):9-12.
10. Tota JE C-DM, Richardson LA, Devries M, Franco EL. Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: implications for prevention strategies. *Preventive Medicine*. 2011;53(1):S12-S21.
11. L. GM. Human Papillomavirus-Related Diseases: Oropharynx Cancers and Potential Implications for Adolescent HPV Vaccination. *J Adolesc Health*. 2008(43):S52-S60.
12. Gerard W. The human papillomavirus (HPV) vaccine, HPV related diseases and cervical cancer in the post-reproductive years. *Maturitas*. 2010;65:205-9.

13. Trotter H FE. The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine*. 2006;24(1):S1--15.
14. Muñoz Nubia CX, González Amy Berrington de, Gissmann Lutz. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine*. 2006;24S3:S3/1-S3/10.
15. Tribius S IA, Rieckmann T, Peterson C, Hoffmann M. Impact of HPV status on treatment of squamous cell cancer of the oropharynx: what we know and what we need to know. *Cancer Letters*. 2011;304(2):71-9.
16. Molijn A KB, Quint W, van Doorn LJ. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. *J Clin Virol*. 2005;32(1):S43-51.
17. Venuti A PF. Hpv Detection Methods in Head and Neck Cancer. *Head and Neck Pathol* 2012;6(1):63-74.
18. Qu W JG, Cruz Y, Chang CJ, Ho GY, Klein RS, Burk RD. PCR detection of human papillomavirus: comparison between MY09/MY11 and GP5+/GP6+ primer systems. *J Clin Microbiol*. 1997;35(6):1304-10.
19. E. Shikova IT, G. Ganchev, V. Kouseva-Dragneva. DETECTION AND TYPING OF HUMAN PAPILOMAVIRUSES BY PCR. *BIOTECHNOL & BIOTECHNOL EQ* 23/2009/SPECIAL EDITION/ON-LINE:887.
20. François Coutlée PG, Janet Kornegay, Catherine Hankins, Harriet Richardson, Normand Lapointe, Hélène Voyer, The Canadian Women's HIV Study Group, e Eduardo Franco. 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.
21. Ukpo OC FJ, Ma XJ, Luo Y, Thorstad WL, Lewis JS Jr. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(9):1343-50.
22. Nobre RJ CE, Real O, de Almeida LP, Martins TC. Characterization of common and rare human papillomaviruses in Portuguese women by the polymerase chain reaction, restriction fragment length polymorphism and sequencing. *J Med Virol*. 2010;82(6):1024-32.
23. Nobre RJ dAL, Martins TC. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *J Clin Virol*. 2008;42(1):13-21.
24. Thorpe Janet BA, Glass Richard. Human papillomavirus infection. *JAMA*. 2007;297(8):902.

25. Bruni L DM, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjosé S. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis.* 2010;202(12):1789-99.
26. Smith JS GP, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of human papillomavirus infection in males: a global review. *J Adolesc Health.* 2011;48(6):540-52.
27. D'Souza G AY, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009;199(9):1263-9.
28. Smith EM SS, Ritchie JM, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26(9):836-40.
29. Kreimer AR BR, Messeguer AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. *Sexually Transmitted Diseases.* 2010;37(6):386-91.
30. Kreimer AR VA, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, Hildesheim A, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Giuliano AR. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(1):172-82.
31. Chin-Hong PV VE, Cranston RD, Buchbinder S, Cohen D, Colfax G, Da Costa M, Darragh T, Hess E, Judson F, Koblin B, Madison M, Palefsky JM. Age-Specific prevalence of anal human papillomavirus infection in HIV-negative sexually active men who have sex with men: the EXPLORE study. *J Infect Dis.* 2004;190(12):2070-6.
32. Vardas E GA, Goldstone S, Palefsky JM, Moreira ED Jr, Penny ME, Aranda C, Jessen H, Moi H, Ferris DG, Liaw KL, Marshall JB, Vuocolo S, Barr E, Haupt RM, Garner EI, Guris D. External genital human papillomavirus prevalence and associated factors among heterosexual men on 5 continents. *J Infect Dis.* 2011;203(1):58-65.
33. Goodman MT SY, McDuffie K, Wilkens LR, Zhu X, Ning L, Killeen J, Kamemoto L, Hernandez BY. Acquisition of anal human papillomavirus (HPV) infection in women: the Hawaii HPV Cohort study. *J Infect Dis.* 2008;197(7):957-66.
34. Pista A. dOCF, Paixão M.T., Real O.; CLEOPATRE Portugal Study Group. Prevalence of human papillomavirus infection in women in Portugal: the CLEOPATRE Portugal study. *Int J Gynecol Cancer.* 2011;21(6):1150-8.
35. Isa Dutra MRS, Marta Soares, Ana R Couto, Maria Bruges-Armas, Fernando Teixeira, Luísa Monjardino, Shirley Hodgson, e Jácome Bruges-Armas. Characterisation of

human papillomavirus (HPV) genotypes in the Azorean population, Terceira island. *Infect Agent Cancer*. 2008;3:6.

36. Burchell AN WR, de Sanjosé S, Franco EL. Chapter 6: Epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. *Vaccine*. 2006;24(3):52-61.

37. Parkin DM BF. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine*. 2006;24(3):11-25.

38. A. C. Hearing addresses condoms for HPV prevention. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(13):985.

39. Kung-Liahng W. Human Papillomavirus And Vaccination in Cervical Cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2007;46(4):352-62.

40. D'Souza G. DA. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Prev Med*. 2011;53(1):S5-S11.

41. García-Closas R CX, Bosch X, González CA. The role of diet and nutrition in cervical carcinogenesis: a review of recent evidence. *Int J cancer*. 2005;117(4):629-37.

42. Giuliano AR SE, Roe DJ, Ferreira S, Baggio ML, Galan L, Duarte-Franco E, Villa LL, Rohan TE, Marshall JR, Franco EL; Ludwig-McGill HPV Natural History Study. Dietary intake and risk of persistent human papillomavirus (HPV) infection: the Ludwig-McGill HPV Natural History Study. *J Infect Dis*. 2003;188(10):1508-16.

43. Richardson H AM, Tellier PP, Kelsall G, du Berger R, Ferenczy A, Coullée F, Franco EL. Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(5):1149-56.

44. Schlecht NF TA, Duarte-Franco E, Rohan TE, Ferenczy A, Villa LL, Franco EL. Viral load as a predictor of the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 2003;103(4):519-24.

45. Villa LL SL, Rahal P, Caballero O, Ferenczy A, Rohan T, Franco EL. Molecular variants of human papillomavirus types 16 and 18 preferentially associated with cervical neoplasia. *J Gen Virol*. 2000;81(Pt 12):2959-68.

46. Vera-Iglesias E G-AM, Sánchez-Caminero P, Romero-Aguilera G, Cortina de la Calle P. Focal Epithelial Hyperplasia. *Actas Dermosifiliogr*. 2007;98:621-3.

47. Finn P. HPV - Associated Diseases of Oral Mucosa. *Clinics in Dermatology*. 1997;15:399-413.

48. Ward Kathleen A. NSS, Winter Paul C., Maw Raymond D., Dinsmore Wallace W. Detection of human papilloma virus DNA sequences in oral squamous cell papillomas by

the polymerase chain reaction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.* 1995;80(1):63-6.

49. Anderson K. Mark MDP, Miles Lili, Allen Carl M., Nuovo Gerard J. The histologic differentiation of oral condyloma acuminatum from its mimics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.* 2003;96(4):420-8.

50. Acay Renata Rodrigues FCR, de Araújo Ney Soares, de Sousa Suzana Orsini Machado. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. *Oral Oncology.* 2006;42:475-80.

51. Verma Madhu LJ. Verrucous carcinoma—an enigmatic entity. *Indian Journal of Dentistry.* 2011;2(2).

52. Ishii J. FK, Komori T. Laser surgery as a treatment for oral leukoplakia. *Oral Oncology.* 2003;39(8):759-69.

53. Moura MD, Haddad JP, Senna MI, Ferreira e Ferreira E, Mesquita RA. A new topical treatment protocol for oral hairy leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.* [Comparative Study Randomized Controlled Trial Research Support, Non-U.S. Gov't]. 2010 Nov;110(5):611-7.

54. de Vicente Juan Carlos H-ZAFMF, López-Arranz Juan Sebastián. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral oncology.* 2002;38(3):301-8.

55. Badolato Raffaele BV, Tassone Laura. Mechanisms of WHIM syndrome. *Drug Discovery Today.* 2005;2(4).

56. Shaw R RM. The increasing clinical relevance of human papillomavirus type 16 (HPV-16) infection in oropharyngeal cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2011;49(6):423-9.

57. H. FI. HPV vaccines and the prevention of cervical cancer. *Update on cancer therapeutics* 2008;3(1).

58. Lin Ken RE, Ma Barbara, Hung Chien-fu, Wu T.-C. Therapeutic HPV DNA vaccines. *Immunol Res.* 2010;47(1-3):86-112.

59. AK C. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol.* 2012;6(1):S16-24.

60. Dufour X. B-DA, Agius G., Lacau St Guily. HPV and head and neck cancer. *Eur Ann of Otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2012;129(1):26-31.

61. Marur S. DSG, Westra W.H., Forastiere A.A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):781-9.

62. Sudhoff H.H. SHP, Winder D., Steintraesser L., Gorner M., Stanley M., Goon P.K. Evidence for a causal association for HPV in head and neck cancers. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268(11):1541-7.
63. Stina S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *Journal of Clinical Virology* 2005;32(1):S59-66.
64. Syrjänen K SS, Lamberg M, Pyrhönen S, Nuutinen J. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg.* 1983;12(6):418-24.
65. Pannone G. SA, Papagerakis S., Lo Muzio L., De Rosa G., Bufo P. The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. *Infect Agent Cancer.* 2011;6.
66. Kreimer AR CG, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467-75.
67. Termine N. PV, Falaschini S., Russo A., Matranga D., Muzio Lo., Campisi G. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007). *Annals of oncology.* 2008;19(10):1681-90.
68. D'Souza G KA, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(19):1944-56.
69. Dayyani F EC, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol.* 2010;2:15.
70. Isayeva T LY, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head and Neck Pathol.* 2012;6(1):S104-20.
71. Boland JM ME, García JJ, Lewis JE, Schembri-Wismayer DJ. Detection of human papilloma virus and p16 expression in high-grade adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Mod Pathol.* 2012;25(4):529-36.
72. Rautava J. KJ, Syrjanen K., Grenman R., Syrjanen S. HPV genotypes and their prognostic significance in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Virol.* 2012;53(2):116-20.

73. Bezerra AL LA, Landman G, Alencar GN, Torloni H, Villa LL. Clinicopathologic features and human papillomavirus dna prevalence of warty and squamous cell carcinoma of the penis. *Am J Surg Pathol.* 2001;25(5):673-8.
74. Rubin MA KB, Zhou M, Ayala G, Cubilla AL, Quint WG, Pirog EC. Detection and typing of human papillomavirus DNA in penile carcinoma: evidence for multiple independent pathways of penile carcinogenesis. *AM J Pathol.* 2001;159(4):1211-8.
75. IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. Lyon:IARC, 2005.
76. Frisch M FC, van den Brule AJ, Sørensen P, Meijer CJ, Walboomers JM, Adami HO, Melbye M, Glimelius B. Variants of squamous cell carcinoma of the anal canal and perianal skin and their relation to human papillomaviruses. *Cancer Res.* 1999;59(3):753-7.
77. H P. Chapter 8: Human papillomavirus and skin cancer. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003(31):52-6.
78. N A Khan AC, C Koriyama, Y Kijima, Y Umekita, Y Ohi, M Higashi, Y Sagara, H Yoshinaka, T Tsuji, S Natsugoe, T Douchi, Y Eizuru, S Akiba. Human papillomavirus detected in female breast carcinomas in Japan. *Br J Cancer.* 2008;99(3):408-14.
79. Hachana M ZS, Amara K, Toumi I, Korbi S, Trimeche M. No evidence of human papillomavirus DNA in breast carcinoma in Tunisian patients. *The Breast.* 2010;19(6):541-4.
80. Di Lonardo A VA, Marcante ML. Human papillomavirus in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1992;21(2):95-100.
81. Hennig EM SZ, Thoresen S, Holm R, Kvinnsland S, Nesland JM. Human papillomavirus 16 in breast cancer of women treated for high grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Breast Cancer Res Treat.* 1999;53(2):121-35.
82. Kroupis C MA, Vourlidis N, Dionyssiou-Asteriou A, Lianidou ES. Presence of high-risk human papillomavirus sequences in breast cancer tissues and association with histopathological characteristics. *Clin Biochem.* 2006;39(7):727-31.
83. Choi YL CE, Kim JH, Nam SJ, Oh YL, Song SY, Yang JH, Kim DS. Detection of human papillomavirus DNA by DNA Chip in breast carcinomas of Korean Women. *Tumor Biol.* 2007;28:327-32.
84. Damin AP KR, Zettler CG, Caleffi M, Alexandre CO. Evidence for an association of human papillomavirus and breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2004;84(2):131-7.
85. Kan CY IB, Lawson JS, Whitaker NJ. Identification of human papillomavirus DNA gene sequences in human breast cancer. *Br J Cancer.* 2005;93(8):946-8.

86. Yu Y MT, Sasa M, Okazaki K, Harada Y, Fujiwara T, Irie Y, Takahashi E, Tanigami A, Izumi K. HPV33 DNA in premalignant and malignant breast lesions in Chinese and Japanese populations. *Anticancer Res.* 1999;19(6B):5057-61.
87. de Villiers EM SR, zur Hausen H, Buck CE. Presence of papillomavirus sequences in condylomatous lesions of the mamillae and in invasive carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res* 2005;7(1):R1-11.
88. Wrede D LY, Coombes RC, Vousden KH. Absence of HPV 16 and 18 DNA in breast cancer. *Br J Cancer.* 1992;65(6):891-4.
89. Lindel K FA, Altermatt HJ, Greiner R, Gruber G. Breast cancer and human papillomavirus (HPV) infection: no evidence of a viral etiology in a group of Swiss women. *Breast Cancer Res.* 2007;16(2):172-7.
90. H. FI. HPV vaccines. *International Journal of Gynecology and Obstetrics.* 2006;94(1):S81-S8.
91. Zhou J SX, Stenzel DJ, Frazer IH. Expression of vaccinia recombinant HPV 16 L1 and L2 ORF proteins in epithelial cells is sufficient for assembly of HPV virion-like particles. *Virology.* 1991;185(1):251-7.
92. M. S. A practitioner's guide to understanding immunity to human papillomavirus *Am Obstet Gynecol.* 2009;4:2-7.
93. Harper DM FE, Wheeler C, Ferris DG, Jenkins D, Schuind A, Zahaf T, Innis B, Naud P, De Carvalho NS, Roteli-Martins CM, Teixeira J, Blatter MM, Korn AP, Quint W, Dubin G; GlaxoSmithKline HPV Vaccine Study Group. Efficacy of a bivalent L1 virus-like particle vaccine in prevention of infection with human papillomavirus types 16 and 18 in young women: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2004;364(9447):1757-65.
94. Harper DM FE, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G; HPV Vaccine Study group. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 2006;367(9518):1247-55.
95. Villa LL CR, Petta CA, Andrade RP, Ault KA, Giuliano AR, Wheeler CM, Koutsky LA, Malm C, Lehtinen M, Skjeldestad FE, Olsson SE, Steinwall M, Brown DR, Kurman RJ, Ronnett BM, Stoler MH, Ferenczy A, Harper DM, Tamms GM, Yu J, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Jansen KU, Esser MT, Sings HL, Saah AJ, Barr E. Prophylactic quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) L1 virus-like particle vaccine in young

women: a randomised double-blind placebo-controlled multicentre phase II efficacy trial. *Lancet*. 2005;6(5):271-8.

96. Villa LL CR, Petta CA, Andrade RP, Paavonen J, Iversen OE, Olsson SE, Høye J, Steinwall M, Riis-Johannessen G, Andersson-Ellstrom A, Elfgren K, Krogh G, Lehtinen M, Malm C, Tamms GM, Giacoletti K, Lupinacci L, Railkar R, Taddeo FJ, Bryan J, Esser MT, Sings HL, Saah AJ, Barr E. High sustained efficacy of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus types 6/11/16/18 L1 virus-like particle vaccine through 5 years of follow-up. *Br J Cancer*. 2006;95(11):1459-66.

97. Olsson SE VL, Costa RL, Petta CA, Andrade RP, Malm C, Iversen OE, Høye J, Steinwall M, Riis-Johannessen G, Andersson-Ellstrom A, Elfgren K, von Krogh G, Lehtinen M, Paavonen J, Tamms GM, Giacoletti K, Lupinacci L, Esser MT, Vuocolo SC, Saah AJ, Barr E. Induction of immune memory following administration of a prophylactic quadrivalent human papillomavirus (HPV) types 6/11/16/18 L1 virus-like particle (VLP) vaccine. *Vaccine*. 2007;25(26):4931-9.

98. B R. Long term protection against cervical infection with the human papillomavirus: review of currently available vaccines. *Hum Vaccin*. 2011;7(2):161-9.

99. Postma TC VHW. Is the human papillomavirus a mutual aetiological agent in oral and cervical squamous cell carcinoma? *Anticancer Res*. 2003;23(4):3509-12.

100. Dias GS AA. A histological and clinical study on oral cancer: descriptive analyses of 365 cases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12(7):E474-8.

101. do Sacramento PR BE, Colombo J, Cabral Ruback MJ, Bonilha JL, Fernandes AM, Pereira Sobrinho JS, de Souza FP, Villa LL, Rahal P. The prevalence of human papillomavirus in the oropharynx in healthy individuals in a Brazilian population. *J Med Virol*. 2006;78(5):614-8.

102. Gillison ML BT, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*. 2012;307(7):693-703.

103. Deidre O Turner SJW-C, Ryan Bullen, Jeremy Catmull, Jesse Falk, Daniel Martin, Jarom Mauer, Annabel E Barber, Robert C Wang, Shawn L Gerstenberger, e Karl Kingsley. High-risk human papillomavirus (HPV) screening and detection in healthy patient saliva samples: a pilot study. *BMC Oral Health*. 2011;11:28.

104. Du Juan NC, Ahrlund-Richter Andreas, Sobkowiak Michal, Romanitan Mircea, Nasman Anders, Andersson Soren, Ramqvist Torbjorn, Dalianis Tina. Prevalence of Oral

Human Papillomavirus Infection among Youth, Sweden. *Emerging infectious diseases*. 2012;18(9).

105. Gichki AS BW, Doungudomdacha S, Khovidhunkit SO. Detection of Human Papillomavirus in Normal Oral Cavity in a Group of Pakistani Subjects using Real-Time PCR. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(5):2299-304.

ANEXOS

8.ANEXOS

8.1 ANEXO A - Consentimento Informado

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS – PÓLO DE VISEU

CONSENTIMENTO INFORMADO

“Prevalência de HPV na saliva da população da Clínica Dentária Universitária da UCP-Viseu”

Eu, Alexandra Almeida Galo, aluna do 5ºano do Mestrado integrado em Medicina Dentária, venho por este meio comunicar que farei um estudo em pacientes selecionados da consulta do serviço de Medicina Dentária da Clínica Universitária, com o objetivo de obter dados relevantes ao desenvolvimento de uma dissertação de mestrado no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, através da recolha de amostras de saliva e posterior consulta do processo clínico.

Os dados recolhidos são estritamente confidenciais e serão exclusivamente utilizados pelos investigadores deste projeto sendo o seu nome codificado.

A participação neste estudo não implicará qualquer encargo para o paciente e não será efetuado nenhum tratamento.

Obrigado pela colaboração

Eu, _____ fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) e autorizo a recolha de saliva e posterior consulta do meu processo clínico.

Estou ciente que esta investigação tem como responsáveis a aluna Alexandra Galo e a Prof. Doutora Maria José Correia.

Viseu, _____ de _____ de 2012

Assinatura do paciente

Assinatura do Aluno

Assinatura do Orientador

8.2 ANEXO B

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
A1	Default	02-08-2012	13:54	9.26	0.185	0.179	1.03	0.13	50.00	230	1.456	0.026
A2	Default	02-08-2012	13:54	16.03	0.321	0.480	0.67	0.12	50.00	230	2.786	1.759
A3	Default	02-08-2012	13:55	5.21	0.104	0.131	0.79	0.04	50.00	230	2.318	0.095
A4	Default	02-08-2012	13:55	4.72	0.094	0.114	0.83	0.03	50.00	230	2.821	0.042
A5	Default	02-08-2012	13:56	13.42	0.268	0.225	1.19	0.07	50.00	230	4.007	0.292
A6	Default	02-08-2012	13:56	7.69	0.154	0.099	1.56	0.02	50.00	230	6.843	0.039
A7	Default	02-08-2012	13:57	9.29	0.186	0.140	1.32	0.08	50.00	230	2.314	0.030
A8	Default	02-08-2012	13:57	6.25	0.125	0.070	1.77	0.13	50.00	230	0.929	-0.317
A10	Default	02-08-2012	13:58	7.36	0.147	0.114	1.29	0.05	50.00	230	3.008	0.074
A11	Default	02-08-2012	13:58	4.83	0.097	0.072	1.33	0.18	50.00	230	0.549	0.040
A12	Default	02-08-2012	13:59	9.94	0.199	0.108	1.84	0.19	50.00	230	1.031	0.062
A13	Default	02-08-2012	13:59	3.01	0.060	0.019	3.24	0.01	50.00	230	7.323	0.033
A14	Default	02-08-2012	14:00	4.30	0.086	0.047	1.82	0.03	50.00	230	2.695	0.055
A15	Default	02-08-2012	14:00	4.24	0.085	0.079	1.07	0.02	50.00	230	4.152	0.021
A16	Default	02-08-2012	14:01	21.18	0.424	0.332	1.28	0.04	50.00	230	9.748	0.088
A17	Default	02-08-2012	14:02	19.29	0.386	0.309	1.25	0.05	50.00	230	8.329	0.057
A18	Default	02-08-2012	14:02	22.96	0.459	0.354	1.30	0.05	50.00	230	8.502	0.091
A19	Default	02-08-2012	14:03	32.67	0.653	0.481	1.36	0.07	50.00	230	9.533	0.095
A20	Default	02-08-2012	14:03	31.61	0.632	0.456	1.39	0.07	50.00	230	8.549	0.074
A21	Default	02-08-2012	14:03	28.84	0.577	0.404	1.43	0.06	50.00	230	10.477	1.363
A22	Default	02-08-2012	14:04	47.12	0.942	0.685	1.38	0.10	50.00	230	9.588	0.132
A23	Default	02-08-2012	14:04	32.86	0.657	0.491	1.34	0.07	50.00	230	9.739	0.115
A24	Default	02-08-2012	14:05	27.49	0.550	0.387	1.42	0.06	50.00	230	8.931	0.099
A25	Default	02-08-2012	14:05	27.34	0.547	0.370	1.48	0.05	50.00	230	11.464	-0.146
A26	Default	02-08-2012	14:06	18.95	0.379	0.267	1.42	0.13	50.00	230	2.849	0.073
A27	Default	02-08-2012	14:06	20.65	0.413	0.273	1.51	0.13	50.00	230	3.175	-0.018
A28	Default	02-08-2012	14:07	17.64	0.353	0.235	1.50	0.23	50.00	230	1.567	0.070
A29	Default	02-08-2012	14:07	21.89	0.438	0.264	1.66	0.24	50.00	230	1.835	0.086
A30	Default	02-08-2012	14:07	24.52	0.490	0.369	1.33	0.18	50.00	230	2.751	0.109
	Default	02-08-2012	14:08	21.48	0.430	0.297	1.45	0.07	50.00	230	6.113	0.200

8.3 ANEXO C

Sample ID	User ID	Date	Time	ng/ul	A260	A280	260/280	260/230	Constant	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw
B1	Default	02-08-2012	14:10	104.45	2.089	2.215	0.94	0.21	50.00	230	9.788	0.184
B2	Default	02-08-2012	14:10	63.76	1.275	1.520	0.84	0.15	50.00	230	8.280	-1.094
B3	Default	02-08-2012	14:11	72.70	1.454	1.598	0.91	0.17	50.00	230	8.524	0.186
B4	Default	02-08-2012	14:11	106.80	2.136	2.323	0.92	0.23	50.00	230	9.427	0.520
B5	Default	02-08-2012	14:12	19.68	0.394	0.315	1.25	0.12	50.00	230	3.167	-2.934
B6	Default	02-08-2012	14:12	166.82	3.336	2.561	1.30	0.41	50.00	230	8.128	7.578
B7	Default	02-08-2012	14:13	26.92	0.538	0.334	1.61	0.07	50.00	230	7.251	0.276
B8	Default	02-08-2012	14:14	26.55	0.531	0.433	1.23	0.09	50.00	230	6.058	0.088
B9	Default	02-08-2012	14:15	23.49	0.470	0.250	1.88	0.07	50.00	230	6.980	0.125
B10	Default	02-08-2012	14:15	21.35	0.427	0.287	1.49	0.07	50.00	230	6.547	0.057
B11B12	Default	02-08-2012	14:16	23.88	0.478	0.299	1.60	0.06	50.00	230	7.499	0.063
B12	Default	02-08-2012	14:17	3.60	0.072	0.030	2.39	0.02	50.00	230	2.932	-0.271
B13	Default	02-08-2012	14:17	30.55	0.611	0.335	1.82	0.32	50.00	230	1.934	4.859
B14	Default	02-08-2012	14:18	18.78	0.376	0.214	1.75	0.06	50.00	230	6.635	0.070
B15	Default	02-08-2012	14:20	31.11	0.622	0.346	1.80	0.08	50.00	230	7.410	0.414
B16	Default	02-08-2012	14:21	38.85	0.777	0.489	1.59	0.10	50.00	230	7.900	0.730
B17	Default	02-08-2012	14:21	40.52	0.810	0.543	1.49	0.10	50.00	230	7.745	1.235
B18	Default	02-08-2012	14:22	26.81	0.536	0.345	1.55	0.07	50.00	230	7.240	0.175
B19	Default	02-08-2012	14:23	4.40	0.088	0.047	1.86	0.05	50.00	230	1.770	-0.098
B20	Default	02-08-2012	14:24	21.90	0.438	0.246	1.78	0.06	50.00	230	7.086	0.122
B21	Default	02-08-2012	14:25	19.55	0.391	0.202	1.94	0.06	50.00	230	6.442	0.185
B22	Default	02-08-2012	14:25	20.95	0.419	0.266	1.58	0.07	50.00	230	5.635	0.157
B23	Default	02-08-2012	14:26	47.39	0.948	0.634	1.50	0.14	50.00	230	6.980	1.527
B24	Default	02-08-2012	14:26	48.74	0.975	0.624	1.56	0.13	50.00	230	7.419	1.033
B25	Default	02-08-2012	14:27	40.95	0.819	0.477	1.72	0.12	50.00	230	7.030	2.002
B26	Default	02-08-2012	14:27	28.80	0.576	0.323	1.78	0.08	50.00	230	7.195	0.261
B26	Default	02-08-2012	14:28	37.77	0.755	0.468	1.61	0.11	50.00	230	6.935	0.501

INDICE DE TABELAS

Índice de tabelas

Tabela 1 Relação entre o tipo de HPV e a doença associada (6)	3
---	---

INDICE DE FIGURAS

Índice de figuras

Figura 1 Constituição do genoma do HPV (4).....	1
Figure 2 Modelo de interação do HPV E6 e E7 com a via de dano ao DNA (1).....	6
Figure 3 Gel para fragmentos do gene da beta-actina humana (amostras 1 a 21). Legenda: Poço A – 100bp <i>ladder</i> ; Poços B a M – Amostras 1 a 12; Poço N – 100bp <i>ladder</i> , Poços O a W – Amostras 13 a 21. A seta azul marca o alinhamento do fragmento da beta-actina humana.....	38
Figure 4 Gel para fragmentos do gene da beta-actina humana (amostras 22 a 40). Legenda: Poço A – 100bp <i>ladder</i> ; Poços B a M – Amostras 22 a 33; Poço N – 100bp <i>ladder</i> ; Poços O a U – Amostras 34 a 40; Poço V – vazio; Poço W – Controlo negativo. A seta azul marca o alinhamento do fragmento da beta-actina humana.	38
Figure 5 Gel para fragmento do gene da BRCA2 (amostras negativas para beta-actina). Legenda: Poço A – 100bp <i>ladder</i> ; Poço B – Vazio; Poço C – Amostras 1; Poço D – Amostra 2; Poço E – Amostra 4; Poço F – Amostra 6; Poço G – Amostra 8; Poço H – Amostra 13; Poço I – Amostra 22; Poço J – Amostra 23; Poço K – Amostra 26; Poço L – Amostra 30; Poço M – Amostra 31; Poço N – Amostra 35; Poço O – Amostra 38; Poço P – Amostra 40; Poço Q – Controlo Negativo; Poço R – Controlo Positivo (Citologia HPV+); Poço S – Controlo Positivo (Amostra 3); Poço T – Vazio. A seta verde marca o alinhamento do fragmento da proteína BRAC2.	38
Figure 6 Gel 2 para fragmento do gene da BRCA2 (repetição de amostras c/ 2x DNA). Legenda: Poço A – 100bp <i>ladder</i> ; Poço B – Amostra 1; Poço C – Amostra 6; Poço D – Amostra 23; Poço E – Amostra 31; Poço F – Amostra 40; Poço G- Controlo Positivo (Citologia HPV+); Poço H – Contr. β Actina positivo (Amostra 3); Poço I – Contr. BRCA2 positivo (Amostra 35); Poço J – Controlo negativo. A seta verde marca o alinhamento do fragmento BRAC2.....	39
Figure 7 Gel para fragmentos MY09/MY11 do gene L1 do genoma do vírus. Legenda Vazios. Legenda Série Verde: Poço a – 100bp <i>ladder</i> ; Poços B a O – Amostras 18 a 31; Poço P – Vazio. Legenda Série Laranja: Poço A – 100bp <i>ladder</i> ; Poços B a J – Amostras 32 a 40; Poço K – Controlo positivo; Poço L – Controlo negativo. A seta vermelha marca o alinhamento do fragmento de L1 amplificado com os primers MY09/MY11.....	39
Figure 8 Gel 1 para fragmentos GP5+/GP6+ do gene L1 do genoma do vírus. Legenda Série Branca: Poço A – 100bp <i>ladder</i> ; Poço B – Vazio; Poços C a S – Amostras 1a 17; Poço T – Vazio. Legenda Série Laranja: Poço A – 100bp <i>ladder</i> ; Poços B a O – Amostras 18 a 31; Poço P – Vazio. Legenda Série Azul: Poço A – 100bp <i>ladder</i> ; Poços B a J – Amostras 32 a 40; Poço K – Controlo negativo; Poço L – Controlo positivo. A seta laranja marca o alinhamento do fragmento de L1 amplificado com os primers GP5+/GP6+.	40
Figure 9 Gel 2 para fragmentos GP5+/GP6+ do gene L1 do genoma do vírus (recast da primeira linha do gel 1). Legenda Série Amarela: Poço A – 100bp <i>ladder</i> ; Poços B a N – Amostras 1 a 13. Legenda Série Verde: Poço A – 100bp <i>ladder</i> ; Poços B a J – Amostras 14 a 22. A seta laranja marca o alinhamento do fragmento de L1 amplificado com os primers GP5+/GP6+.	41
Figure 10 Resultado de um alinhamento típico entre uma amostras de HPV (E03_G95) e os fragmento obtidos para as amostras M14 e G23.....	42

INDICE DE GRÁFICOS

Índice de Gráficos

Gráfico 1.....	37
----------------	----

INDICE DE ABREVIATURAS

Índice de abreviaturas

HPV – Human Papillomavirus

DNA – Deoxyribonucleic Acid

PCR – Polymerase Chain Reaction

ORF – Open Reading Frame

NIC – Neoplasia Intraepitelial Cervical

HIS – Hibridização *In Situ*

FDA – Food and Drug Administration

IHQ – Imunohistoquímica

PHIS – PCR Hibridização *In Situ*

CCE – Carcinoma das Células Escamosas

RNA – Ribonucleic Acid

cDNA – complement DNA

cRNA – complement RNA

CCECP – Carcinoma das Células Escamosas da Cabeça e Pescoço

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

ALH – Antígenos Leucocitários Humanos

DST – Doenças Sexualmente Transmissíveis

NIH – National Institutes of Health

NIV – Neoplasia Intraepitelial Vulvar

NIVA – Neoplasia Intraepitelial Vaginal

EV – Epidermodisplasia Verruciforme

CPNM – Cancro da Pele Não Melanoma

IARC – International Agency for Research on Cancer

VLP – Vírus Like Particles