

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES E SUA
RELAÇÃO COM O PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM CARCINOMAS
DE CABEÇA E PESCOÇO**

Rosane Giacomini

Rosane Giacomini

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES E SUA
RELAÇÃO COM O PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM CARCINOMAS
DE CABEÇA E PESCOÇO**

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia”, orientada por Fábio Firmbach Pasqualotto e co-orientada por Alessandra Eifler Guerra Godoy.

Caxias do Sul, 2017

G429e Giacomini, Rosane

Expressão imunohistoquímica de biomarcadores e sua relação com o Papilomavírus humano em carcinomas de cabeça e pescoço / Rosane Giacomini. – 2017.

106 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2017.

Orientação: Fábio Fimbach Pasqualotto.

Coorientação: Alessandra Eifler Guerra Godoy.

1. Câncer 2. HPV 3. Cabeça e pescoço 4. Biomarcadores. I. Pasqualotto, Fábio Fimbach, orient. II. Godoy, Alessandra Eifler Guerra, coorient. III. Título.

Rosane Giacomini

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES E SUA
RELAÇÃO COM O PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM CARCINOMAS
DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 01 DE DEZEMBRO DE 2017.

Orientador: _____

Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto

Co-Orientadora: _____

Dra. Alessandra Eifler Guerra Godoy

Banca Examinadora:

Dra. Eleonora Bedin Pasqualotto

Dra. Marcia Silveira Graudenz

Dr. Victor Hugo Valiati

DEDICATÓRIA

A Deus por ter me dado este grande desafio, por colocar no meu caminho as pessoas certas, nos momentos certos e principalmente por me conceder calma e confiança espiritual para prosseguir até o fim.

À minha família por representarem a base do meu caráter, ser fonte de inspiração nos momentos nebulosos e ponto de equilíbrio, tanto na empolgação excessiva das conquistas, quanto no desalento das falhas.

Ao Felipe pelo apoio em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos fora da zona de conforto. Por poder contar com seu ombro amigo e amor incondicional.

À Professora Alessandra pela oportunidade de realizar este trabalho, pela paciência, amizade, por todos os ensinamentos, por confiar na minha capacidade e, desta forma, fazer com que eu buscasse o melhor em mim.

Ao Professor Fábio pela disposição em me orientar, pelas palavras de incentivo, pela atenção e apoio dado durante o processo de elaboração e execução deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Caxias do Sul (UCS), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de fazer este curso.

Ao Laboratório Diagnose pela instrução e suporte quanto às técnicas utilizadas no laboratório.

Ao Serviço de Oncologia do Hospital Geral de Caxias do Sul por ter cedido parte das amostras utilizadas neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos.

A todos aqueles que não mencionei e que, de alguma forma, contribuíram para a execução deste trabalho.

ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO	15
2.1.1 Epidemiologia	16
2.1.2 Fatores de risco.....	18
2.1.2.1 Tabagismo	19
2.1.2.2 Etilismo.....	20
2.1.2.3 HPV	21
2.1.3 HPV e carcinoma de cabeça e pescoço	29
2.1.3.1 Transmissão	29
2.1.3.2 Métodos de detecção e tipagem do HPV	31
2.1.3.3 Prevenção	32
2.1.3.4 Tratamento.....	35
2.1.4 Biomarcadores.....	37
2.1.4.1 p16.....	38
2.1.4.2 Survivina.....	40
2.1.4.3 PD-L1	43
3. OBJETIVOS	49
3.1 OBJETIVO GERAL	49
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
4. MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	50
4.2 BIOLOGIA MOLECULAR	50

4.3 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	53
4.3.1 Quantificação da Imunohistoquímica.....	54
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	54
4.5 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	54
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1 DADOS CLÍNICOS	55
5.2 AVALIAÇÃO DO HPV	56
5.3 EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE p16	61
5.4 EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE SURVIVINA	62
5.5 EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE PD-L1	63
5.6 PAINEL DE BIOMARCADORES	65
5.7 HPV E CARCINOGENESE EM CABEÇA E PESCOÇO	70
6. CONCLUSÕES.....	72
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Primers</i> utilizados na PCR “nested”	52
Tabela 2: Dados clínicos dos CECP estudados	56
Tabela 3: Detecção e tipagem do HPV	57
Tabela 4: Idade dos pacientes diagnosticados com CECP	59
Tabela 5: Informações quanto ao etilismo e tabagismo dos pacientes diagnosticados com CECP	60
Tabela 6: Informações quanto ao estadiamento dos CECP	61
Tabela 7: Expressão imunohistoquímica de p16	62
Tabela 8: Expressão imunohistoquímica de survivina na faringe e laringe	63
Tabela 9: Expressão imunohistoquímica de PD-L1 na faringe e laringe	65

LISTA DE FIGURAS

<p>Figura 1: Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica, expressão, nuclear e/ou citoplasmática, de p16 > 50% (A) e ≤50% (B). Células com marcação (setas). Escala: 20µm.</p>	61
<p>Figura 2: Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica, expressão, nuclear e/ou citoplasmática, de survivina ≥ 5% (A) e <5% (B). Células com marcação (setas). Escala : 20µm.....</p>	62
<p>Figura 3: Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica, expressão, membranosa, de PD-L1 ≥ 5% (A) e <5% (B). Células com marcação (setas). Escala: 20µm.</p>	64
<p>Figura 4: Expressão imunohistoquímica de p16, survivina e PD-L1, nos casos avaliados.....</p>	66
<p>Figura 5: Painel de biomarcadores e prognóstico dos CECPs.</p>	69

RESUMO

O câncer de cabeça e pescoço é considerado a sexta neoplasia mais prevalente no mundo, com mais de seiscentos mil novos casos diagnosticados a cada ano, e a quinta mais prevalente no Brasil, com mais de mil e quinhentas pessoas acometidas anualmente, tornando-se responsável, mundialmente, por quatro por cento da mortalidade por câncer. O tipo mais comum é o carcinoma epidermoide (CECP), sendo sua patogênese historicamente associada ao uso de tabaco e álcool, porém, nas últimas décadas, a infecção pelo HPV tem sido associada à doença. Definir o prognóstico e o risco de desenvolvimento, assim como o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constituem a principal razão para a identificação de biomarcadores, já que sua expressão pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais. Vários estudos correlacionaram a expressão de survivina, nos tumores sólidos, com um curso clinicamente desfavorável da doença, resistência a fármacos, pior prognóstico e menor sobrevida do paciente. p16 pode fornecer evidências do potencial maligno de uma lesão, e sua superexpressão pode ser considerada um marcador de prognóstico favorável. A expressão elevada de PD-L1 pode ser um importante facilitador para o crescimento tumoral e metástases. O objetivo deste trabalho foi identificar, por imunohistoquímica, os níveis de expressão de p16, survivina e PD-L1 em amostras de lesões malignas de cabeça e pescoço na presença e na ausência de infecção viral por HPV e relacioná-los com os achados clínicos dos pacientes. Foram utilizadas trinta e três amostras teciduais, obtidas por biópsia de lesões de cabeça e pescoço, com finalidade diagnóstica, provenientes do Serviço de Oncologia Do Hospital Geral de Caxias do Sul e do banco de dados do Laboratório Diagnose. As amostras foram selecionadas retrospectivamente, tendo como critério de seleção a presença de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. A determinação da presença do HPV e tipagem viral foi realizada pelo método da reação em cadeia da polimerase e a expressão proteica por imunohistoquímica. Os resultados foram avaliados considerando a proporção de células positivas comparadas ao número total de células no campo. A superexpressão de p16 nos CECPs pode ser um indicativo da participação da infecção por HPV durante o processo de carcinogênese, sendo que a relação entre a superexpressão de p16 e presença de infecção por HPV não foi observada em alguns dos casos avaliados, podendo indicar: falha na realização da PCR, não detectando a presença do HPV; a não participação do HPV no processo de carcinogênese; o sinergismo entre as vias carcinogênicas HPV+ e HPV- (tabagismo/etilismo). Além disso, a superexpressão de p16 em conjunto com a expressão de survivina e/ou PD-L1 indicam um comportamento intermediário entre os cânceres HPV+ e HPV- (via carcinogênica tabagismo/etilismo). p16, survivina e PD-L1 são indicativos da via carcinogênica HPV+ e podem predizer se houve sinergismo entre as vias carcinogênicas, bem como indicar o comportamento dos tumores, entretanto não devem ser utilizados isoladamente, incluindo a PCR para HPV. Os biomarcadores avaliados neste trabalho podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, sendo necessária a obtenção de um maior número de casos e de informações sobre a expressão desses biomarcadores.

PALAVRAS-CHAVE: câncer; cabeça e pescoço; biomarcadores.

ABSTRACT

Head and neck cancer is considered the sixth most prevalent neoplasm in the world, with more than six hundred thousand new cases diagnosed each year and the fifth most prevalent in Brazil, with more than one thousand five hundred people affected annually, being responsible, worldwide, by four percent of cancer mortality. The most common type is squamous cell carcinoma (CECP), its pathogenesis has been historically associated with tobacco and alcohol use, but in the last decades HPV infection has been associated with the disease. Defining the prognosis and risk of development, as well as the success of the treatment in response to a particular medication and/ or procedure, are the main reason for the identification of biomarkers, and their expression may reflect several processes in progress in tumor cells. Several studies have correlated the expression of survivin in solid tumors with a clinically unfavorable course of the disease, drug resistance, worse prognosis and shorter patient survival. p16 may provide evidence of the malignant potential of an injury, and its overexpression may be considered a favorable prognostic marker. Elevated PD-L1 expression may be an important facilitator for tumor growth and metastasis. The objective of this work was to identify, by immunohistochemistry, the levels of expression of p16, survivin and PD-L1 in samples of head and neck malignant lesions in the presence and absence of HPV viral infection and to relate them to the clinical findings of patients. Thirty-three tissue samples were used, obtained by biopsy of head and neck lesions, for diagnostic purposes, coming from the Oncology Service of the General Hospital of Caxias do Sul and from the Diagnose Laboratory database. Samples were retrospectively selected, having as selection criterion the presence of squamous cell carcinoma of the head and neck. The determination of the presence of HPV and viral typing was performed by the polymerase chain reaction method and the protein expression by immunohistochemistry. The results were evaluated considering the proportion of positive cells compared to the total number of cells in the field. The overexpression of p16 in CECPs may be indicative of the participation of HPV infection during the carcinogenesis process, being that the relationship between p16 overexpression and the presence of HPV infection was not observed in some of the evaluated cases, which may indicate: failure in the PCR achievement, not detecting the presence of HPV; the non-participation of HPV in the process of carcinogenesis; the synergism between the carcinogenic pathways HPV+ and HPV- (smoking/alcoholism). In addition, the overexpression of p16 in conjunction with the expression of survivin and/or PD-L1 indicates an intermediate behavior, between cancers HPV+ and HPV- (pathway carcinogenic smoking/alcoholism). p16, survivin and PD-L1 are indicative of the carcinogenic pathway HPV+, and may predict if there was synergism between carcinogenic pathways as well as indicate the behavior of tumors, however should not be used in isolation, including PCR for HPV. The biomarkers evaluated in this study may be useful in the clinical management of patients, besides helping in the development of new therapeutic modalities, being necessary to obtain a greater number of cases and information on the expression of these biomarkers.

KEY WORDS: cancer; head and neck; biomarkers.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) compreende um grupo heterogêneo de neoplasias malignas localizadas no trato aerodigestivo superior (Torre et al., 2015), com incidência mundial de mais de 600.000 novos casos por ano, sendo responsável por 4% da mortalidade por câncer no mundo (Ferlay et al., 2015). O tipo mais comum das neoplasias malignas na região de cabeça e pescoço são carcinomas epidermóides (Karia et al., 2013).

A patogênese do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) tem sido associada historicamente ao uso de tabaco e álcool (Mashberg et al., 1993), porém nem todos os casos estão associados a esses comportamentos de alto risco. Em 1983, evidências de infecção pelo papilomavírus humano (HPV) foram identificadas em um subconjunto de carcinomas de orofaringe (Syrjanen et al., 1993) e, desde essa data, o HPV tem sido claramente implicado como agente causador em um subconjunto de CECP (IARC, 1995).

A prevalência de CECP associado ao HPV aumentou drasticamente nos países desenvolvidos, afetando predominantemente o sexo masculino com idade mais jovem em relação aos carcinomas associados ao tabaco e álcool (Baboci et al., 2016). Kreimer et al (2005) estabeleceram uma prevalência mundial de 25,9%, ao passo que Termine et al (2008) estimaram uma prevalência mundial de 34,5%.

Os resultados da associação do HPV ao CECP, entretanto, ainda são controversos (Spíndula-Filho et al., 2011). Isso pode ocorrer devido a variações na sensibilidade e especificidade dos métodos utilizados para detecção do vírus, bem como a ausência de padronização e também a diversidade de técnicas laboratoriais para estudo do vírus (Jordan, 2012). Estudos efetuados mostram que os CECP induzidos pelo HPV, estão associados a um melhor prognóstico, em relação os cânceres negativos para o HPV (Nagel et al., 2013).

Definir o risco de desenvolvimento e o prognóstico, assim como o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constitui a principal razão para a identificação de marcadores biológicos ou biomarcadores, sendo que sua expressão pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais (Srinivas et al., 2001).

Vários estudos correlacionaram a expressão de survivina, nos tumores sólidos, com um curso clinicamente desfavorável da doença, resistência a fármacos, pior prognóstico e menor sobrevida do paciente (Church & Talbot, 2012). p16 pode fornecer evidências do potencial maligno de uma lesão e sua superexpressão pode ser considerada um marcador de prognóstico favorável (Yuen et al., 2002; Liang et al., 2012; Lewis, 2012). A expressão

elevada de PD-L1 pode ser um importante facilitador para o crescimento tumoral e metástases (Chen et al.,2012; Chen & Mellman, 2013; Quezada & Peggs, 2013).

A obtenção de um maior número de informações sobre a expressão dos biomarcadores pode auxiliar na decisão terapêutica, podendo ser útil no manejo clínico dos pacientes, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. Neste sentido, o presente estudo visou avaliar a expressão imunohistoquímica dos biomarcadores p16, survivina e PD-L1 em amostras de lesões malignas de cabeça e pescoço na presença e na ausência de infecção viral por HPV e a relação com os achados clínicos dos pacientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

O conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo é chamado de câncer, neoplasia ou tumor maligno (INCA, 2017).

As células apresentam a capacidade de controlar sua proliferação, diferenciação, sobrevivência e/ou apoptose, porém esses mecanismos celulares podem falhar, acarretando uma transformação neoplásica dessas células (Fisher, 1994). O câncer se desenvolve quando células anormais deixam de seguir o processo natural de divisão, amadurecimento e morte do ciclo celular, sofrendo mutação que pode provocar danos em um ou mais genes de uma única célula (INCA, 2017), podendo resultar na ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais (Almeida et al, 2015), sendo assim induzidas ao desenvolvimento desordenado, produzindo novas células anormais, que se agrupam umas sobre as outras e, por fim, formam uma massa de tecido chamada tumor (INCA, 2017).

O processo de carcinogênese ocorre devido ao acúmulo progressivo de modificações genéticas e epigenéticas que induzem as células normais a assumirem padrões extremamente específicos (Hanahan & Weinberg, 2011). Essas mudanças celulares raramente ocorrem sem um fator iniciante ou fatores estimulantes. Tais fatores, também ditos como carcinógenos, podem ser químicos, físicos ou biológicos a depender da sua origem e a forma de interação com o organismo (Brasileiro Filho, 2009).

O mecanismo de desenvolvimento do câncer é descrito em três etapas: 1) a iniciação, fase em que há a exposição ao cancerígeno causando lesão definitiva do DNA; 2) a promoção que, com a exposição a agentes promotores por longos períodos de tempo, provoca a malignidade da célula; 3) a fase de progressão, na qual as células se multiplicam de forma descontrolada e aparecem os sintomas da doença (Leite & Lopes, 2000).

As células tumorais diferem das células normais por um conjunto de características como: a capacidade de produzir sinais de crescimento celular, a produção intensa de sinais anticrescimento para o tecido hospedeiro, a evasão dos sinais de morte celular programada e a capacidade ilimitada de proliferação, angiogênese, invasão tecidual e metástase (Hanahan & Weinberg, 2000).

Existem mais de 100 tipos de cânceres distintos, e dentro do mesmo órgão existem subtipos específicos (Hanahan & Weinberg, 2000). A principal diferença é o tipo de célula ou

órgão onde têm origem. (Cotran et al., 1999; National Cancer Institute, 2014), uma vez que, dependendo das características das células envolvidas, é um processo que pode ser rápido ou levar anos (INCA, 2017).

A expressão CCP define um grupo heterogêneo de neoplasias malignas localizadas no trato aerodigestivo superior. Esta região anatômica inclui a cavidade oral, faringe e laringe. Um dos principais subgrupos do CCP é conhecido como câncer oral ou da cavidade oral, que surgem nas membranas mucosas da boca, ou seja, lábio, base da língua, língua, gengiva, assoalho da boca e palato. O outro subgrupo compreende o câncer de faringe, que incluem a orofaringe, hipofaringe e nasofaringe. Outros tumores que ocorrem nessa área como os do cérebro, tireóide e melanoma, convencionalmente, não estão incluídos no termo "câncer de cabeça e pescoço", portanto, são tratados separadamente. Os tumores das principais glândulas salivares são excluídos deste grupo por apresentarem histórias naturais bastante distintas, etiologias e estruturas histológicas mal compreendidas (Döbrossy, 2005).

O termo "câncer de cabeça e pescoço" é relatado na literatura como um termo de junção dos carcinomas de células escamosas ou carcinomas epidermóides dessa região anatômica, que são responsáveis por 90% de todos os cânceres da região. Isto porque eles compartilham fatores de risco comuns, e há semelhanças em sua epidemiologia, prognóstico e tratamento (Döbrossy, 2005; Mehrotra & Yadav, 2006; Alvarenga et al., 2008).

2.1.1 Epidemiologia

O câncer é considerado um problema de saúde pública, principalmente entre os países em desenvolvimento. A estimativa mundial, realizada em 2012, pelo projeto Globocan/Iarc, apontou que, dos 14 milhões (exceto câncer de pele não melanoma) de novos casos estimados, mais de 60% ocorreram em países em desenvolvimento. A situação agrava-se para a mortalidade quando se constata que, dos 8 milhões de óbitos previstos, 70% aconteceram nesses mesmos países (INCA, 2017).

Segundo a World Health Organization (WHO), o câncer é uma das principais causas de mortes no mundo (WHO, 2017). A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos, sendo que o aumento do número de novas ocorrências resulta do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2017).

O tipo mais comum de CCP é o carcinoma epidermoide, também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular (Kamangar, 2006), correspondendo a 20% dos tumores epiteliais malignos que acometem caucasianos (Vasconcelos et al., 2014). Quase 95% do total de casos afetam indivíduos do sexo masculino, acima dos 45 anos de idade. Devido à maior exposição aos fatores desencadeadores deste tipo de câncer, observa-se um aumento de casos no sexo feminino (Pollock et al., 2006), a relação masculino: feminino para o Brasil foi de 3:1 em pacientes com mais de 60 anos e 8:1 antes dos 60 anos (INCA, 2017). De acordo com a idade, a incidência deste tipo de câncer aumenta, sendo que a maioria dos pacientes se encontra acima dos 50 anos de idade (Bast et al., 2000).

Atualmente o CECP é considerado a sexta neoplasia mais prevalente no mundo, com mais de 600.000 casos novos diagnosticados a cada ano (Ferlay et al., 2015) e a 5ª mais prevalente no Brasil, com mais de 15000 pessoas acometidas anualmente (INCA, 2017), sendo responsável por 4% da mortalidade por câncer no mundo (Ferlay et al., 2015).

A incidência de CECP é maior em países em desenvolvimento (Chaturvedi et al., 2013; Chi et al., 2015). A última estimativa mundial apontou que ocorreriam cerca de 300 mil novos casos e 145 mil óbitos para o ano de 2012 por câncer de boca e lábio. Desses, cerca de 80% ocorreram em países em desenvolvimento (INCA, 2017).

O CECP pode afetar diferentes áreas anatômicas (Freitaset al., 2011). No Brasil, as localizações mais freqüentes são a cavidade oral e laringe (Brasil, 2014). A estimativa para 2016 foi de 11.140 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres, correspondendo a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, na Região Sul, o câncer da cavidade oral em homens é o 6º mais frequente (15,91/100 mil) e em mulheres é 15º (3,32/100 mil). Para o câncer de laringe, foi estimado para 2016, 6.360 casos novos em homens e 990 em mulheres. O risco estimado foi de 6,43 casos a cada 100 mil homens e de 0,94 casos a cada 100 mil mulheres. Na Região Sul, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer da laringe ocupa a sétima posição em homens (10,85/100 mil) e entre as mulheres ocupa a décima sexta posição (1,45/100 mil) (INCA, 2017).

Estudos recentes mostram uma diminuição da incidência de câncer de cavidade oral, especialmente em países desenvolvidos, e assinalam aumento da incidência de câncer de orofaringe, notadamente relacionado à infecção por HPV (Chaturvedi et al., 2013; Chi et al., 2015). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) não possui dados publicados de incidência para tumores de orofaringe (INCA, 2017).

Quando o CECP é diagnosticado em seu estágio inicial a expectativa de sobrevida livre da doença varia entre 60 a 90%. Nos casos restantes, quando a doença é detectada em estágio avançado, cerca de 50% dos casos têm tumores potencialmente ressecáveis com chance de sobrevida variando em 40-50%. Nos casos avançados e não ressecáveis, o prognóstico é pior, com uma taxa de sobrevida variando de 10 a 40% em 5 anos (Adrien et al, 2014). A maioria dos casos são diagnosticados em estágio clínico avançado da doença (Herchenhorn, 2004; Leitzmann et al., 2008), sendo que, sua taxa de mortalidade atinge 50% dos casos em 5 anos (Perez-Ordeñez et al., 2006; Heroui et al., 2013).

2.1.2 Fatores de risco

O CECP é uma doença multifatorial, decorrente de fatores ambientais e genéticos (Hitt & Echarri, 2006), seu desenvolvimento é um processo que ainda não está completamente entendido, entretanto existem evidências que sugerem o papel de vários fatores associados, individualmente ou em conjunto, a um risco aumentado da ocorrência deste tipo de câncer (Döbrossy, 2005). A exposição a determinados agentes químicos, físicos ou biológicos em um paciente geneticamente propenso ao promover mutações genéticas, desencadearão o desenvolvimento do tumor maligno (Porcaro-Salles, 2007).

Os principais fatores de risco para os CECPs são o tabagismo e o etilismo, juntos esses fatores têm um efeito mutagênico sinérgico e aumentam consideravelmente a chance de desenvolvimento do câncer (Thavaraj et al., 2011). A infecção viral por HPV também tem sido considerada um fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de tumor (Ovchinnikov et al., 2014). Ainda existem estudos efetuados que comprovaram a influência da hereditariedade no desenvolvimento desta neoplasia (Slebos et al., 2006). Além disso, deve-se considerar outros fatores relacionados aos hábitos de vida à ocupação e à classe social (Curado, 2008).

Segundo a literatura os CECPs podem ser divididos em HPV- e HPV+, uma vez que apresentam fatores de risco, oncogênese e prognósticos distintos (Syrjanen, 2010; Mirghani et al., 2015a). De acordo com a revisão realizada por Leemans et al., (2011), enquanto que os carcinomas HPV- estão associados ao tabagismo e consumo excessivo de álcool, a uma faixa etária acima dos 60 anos e a um mau prognóstico, os carcinomas HPV+ estão associados a uma faixa etária abaixo dos 60 anos e a um prognóstico mais favorável.

A hipótese de sinergismo entre o consumo de tabaco e álcool e a presença do HPV no câncer da cavidade oral ou de orofaringe, apesar de proposta por alguns autores, não foi

confirmada por um estudo realizado nos Estados Unidos (D'Souza et al., 2007). Apesar de já serem compreendidos os mecanismos de imortalização de células epiteliais normais por parte das oncoproteínas do HPV, ainda se desconhece o seu possível efeito na promoção de virulência em células já alteradas, ou seja, em carcinomas espidermoides HPV- (Lee et al., 2015).

2.1.2.1 Tabagismo

O tabaco é uma árvore – *Nicotiana tabacum* – da qual se extrai cerca de 4.700 substâncias tóxicas, sendo que 60 dessas são consideradas carcinogênicas, além da nicotina, que é de natureza estimulante (Zaituneet al., 2012; INCA, 2017). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas e as N-nitrosaminas são os três grupos dos principais agentes carcinogênicos (Latorre et al., 2005).

Em diversos países, observou-se que o consumo de tabaco está correlacionado a grupos de menor renda, pior nível educacional e no exercício de ocupações precárias (Federico et al., 2004; Fukuda et al., 2005). Sua utilização pode ocorrer de várias maneiras, inalado (cigarro, cachimbo, charuto e cigarrilha), aspirado (rapé) ou mascado (fumo de rolo) (INCA, 2017). Essas diferenças no modo de utilização são importantes, uma vez que podem refletir no processo da carcinogênese (Obid, 2017). Muitos agravos à saúde tabacorelacionados decorrem de sua utilização constante (Mackay & Eriksen, 2002).

Desde o estudo clássico de Doll e Hill (1950), que mostrou estreita relação do tabagismo com o câncer de pulmão, muitos outros estudos mostraram associação com outros tipos de neoplasias malignas (Secretan, 2009). Os carcinogênicos existentes no fumo do tabaco são responsáveis pela formação de alterações neoplásicas, induzindo mudanças genéticas, cuja taxa e acumulação está dependente do equilíbrio entre a dosagem de fumo inalado e a suscetibilidade do hospedeiro (Singh, 2008). O ato de fumar/mascar tabaco pode acarretar reações oxidativas nos tecidos, que têm sido implicadas na iniciação de reações que produzem radicais livres nos eventos celulares. Assim, a presença de oxigênio reativo pode causar dano aos lipídios, aos carboidratos, às proteínas e ao DNA. O menor dano ao DNA pode resultar em mutagênese e em alteração no ciclo celular. Além disso, vários produtos da combustão advindos do ato de fumar tabaco são carcinogênicos, dos quais os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são predominantes. Um aumento da permeabilidade da mucosa bucal facilita a passagem da N-nitrosornicotina, uma das nitrosaminas mais carcinogênicas do cigarro (Madani et al., 2014).

Dependendo do tipo e da quantidade do tabaco utilizado, os tabagistas apresentam probabilidade de 4 a 15 vezes maior de desenvolver o CECP que os não tabagistas. Segundo O'Regan et al. (2006), 41% dos CECP podem estar relacionados ao hábito de fumar. Existem evidências que estimam que aproximadamente 60% dos cânceres orais nos homens e 30% nas mulheres possam ser atribuídos apenas ao fumo do tabaco (Bray et al., 2002). Ribeiro et al. (2009) mostraram que dos 46 casos de carcinoma epidermoide em jovens brasileiros, com média de idade abaixo de 45 anos, 70% eram tabagistas e etilistas, e 65% foram diagnosticados em estadiamento clínico III e IV. Conforme Souza (2009), o tabaco é responsável por 90% dos casos de carcinoma epidermoide oral e é prejudicial nas suas diversas formas, tanto mascado como fumado.

2.1.2.2 Etilismo

Etanol é o álcool presente nas bebidas alcoólicas, produzido tanto por fermentação como por destilação de vegetais, grãos e frutas (Obid, 2017). A ingestão de bebidas alcoólicas é milenar, permeando a história e cultura dos povos (Vargas et al., 2009). Muitas pessoas não imaginam que as bebidas alcoólicas são drogas potentes pelo fato de seu consumo ser aceito socialmente. De acordo com a rapidez e a frequência com que ele é consumido, com a quantidade de alimentos ingerida durante o consumo, com o peso e estado de espírito da pessoa, os efeitos do álcool variam (INCA, 2017).

A identificação dos segmentos populacionais mais suscetíveis à ingestão de álcool em excesso tornou-se importante, pois a elevada prevalência deste consumo é que o torna um problema de saúde pública. Seu uso leve e moderado oferece benefícios cardiovasculares e na esfera social, já o uso crônico e indiscriminado leva os usuários a várias doenças físicas e mentais de grande gravidade, com profundo impacto econômico e social (Vargas et al., 2009).

Em um estudo epidemiológico, na população adulta brasileira, no período de 2006-2009, sobre o consumo de bebidas alcoólicas foi observado a tendência crescente da ingestão abusiva nos dois sexos, embora entre os homens tenha ocorrido a maior frequência de consumo (Moura & Malta, 2011).

Atualmente, existem evidências suficientes sobre o potencial carcinogênico do álcool para o ser humano. Seu papel como fator de risco em diversos sítios do corpo humano, que inclui a cavidade oral, laringe e faringe são comprovadas por uma vasta documentação científica. No entanto, não é bem conhecido o papel do consumo excessivo de álcool no mecanismo de carcinogênese (Andreotti, 2004).

Biologicamente é plausível que o caráter carcinogênico do álcool versa tanto via reação físico-química, tendo um papel de facilitador da penetração de substâncias carcinogênicas pela membrana por ser o etanol um solvente (Schlecht et al., 2001), tanto quanto por efeitos metabólicos, pois há formação de acetaldeído durante o processo de oxidação no metabolismo do etanol, que é um agente carcinogênico (Homann et al., 2000). Os mecanismos de carcinogênese podem ser diretos ou indiretos. Os efeitos diretos do álcool na carcinogênese passam pelo seu metabolismo, com a formação de acetaldeído, pela enzima álcool desidrogenase. Os efeitos carcinogênicos do acetaldeído passam pela ligação ao DNA e pela alteração da transferência dos grupos metilo, o que resulta numa hipometilação que vai afetar a transcrição de inúmeros genes. Também durante o metabolismo do álcool são formadas espécies reativas de oxigênio, que exercem também efeitos mutagênicos (Singh, 2008). Além disso, o consumo de álcool pode alterar o metabolismo intracelular das células epiteliais com as quais ele entra em contato (efeito local). Este prejuízo da função celular pode ser agravado se coexistirem deficiências nutricionais (Petti et al., 2013). O álcool também atua como solvente aumentando a exposição da mucosa a outros agentes carcinogênicos, facilitando a absorção celular e potencializando a ação dos agentes cancerígenos do tabaco (Leite & Lopes, 2000; Galbiatti et al., 2013). O fumo e o consumo de álcool são, geralmente, fatores coexistentes, tornando difícil avaliar seus efeitos individualmente (Carrard et al., 2008). O acetaldeído, primeiro metabólito do etanol, parece agir como um solvente, facilitando a passagem de carcinógenos através das membranas celulares. O consumo de álcool também eleva a atividade metabólica do fígado, podendo, por conseguinte, ativar substâncias carcinogênicas (Petti et al., 2013).

No Brasil, a relação entre álcool e câncer tem sido avaliada por meio de estudos de caso-controle, que estabeleceram a associação epidemiológica entre a ingestão de álcool e cânceres da cavidade oral e de esôfago. O risco de câncer nestas e em outras localizações, como a faringe e a laringe supraglótica aumenta ainda mais quando ocorre uso combinado de álcool e tabaco (INCA, 2017). O álcool é responsável, principalmente, pelos casos de carcinomas epidermóides localizados na língua e assoalho bucal (Anantharaman et al., 2014).

2.1.2.3 HPV

Inicialmente descoberto por Strauss em 1949 (Quintero et al., 2013) o HPV pertence a uma família de vírus chamada *Papillomaviridae*. São vírus pequenos e epiteliotrópicos tendo aproximadamente 55 nm de diâmetro, compostos por DNA circular dupla-fita com cerca de

8.000 pares de bases envolvidos em um capsídio icosaédrico, que possui 72 capsômeros (Sarruf, 1997; Betiol et al., 2007; Villa & Sichero, 2013;). O genoma desses vírus é dividido em região reguladora (LCR - *long control region*), que possui a origem de replicação (ORI) e a maior parte dos promotores de transcrição, e em regiões codificadoras que são denominadas ORF (*open reading frame*), divididas nas regiões precoces e tardias, de acordo com a etapa do ciclo viral em que seus genes são expressos. A região precoce (*Early Region*) é composta por sete genes (E1, E2, E4, E5, E6, E7 e E8) e a região tardia (*Late Region*) por 2 genes (L1 e L2) (Southern & Herrington, 1998). Na região precoce encontramos o DNA para a replicação viral (E1, E2), regulação da expressão (E2), montagem e liberação do vírus (E4) e imortalização e transformação celular (E5, E6 e E7). E3 e E8 têm ação desconhecida, estando presentes em apenas uma minoria dos papilomavírus. Os genes L1 e L2 codificam duas proteínas do capsídeo viral (Garland, 2002; St Guily et al., 2011; Vietía et al., 2014).

A atual classificação taxonômica para HPV fornecida pelo Centro Internacional de Referência do Papilomavírus Humano, sediado no Karolinska Institutet (Solna, Suécia) determina que a classificação deva ser baseada na sequência nucleotídica do gene codificante para a proteína L1 do capsídeo viral. Tipos de HPV pertencentes a diferentes gêneros (alfa-papilomavírus, beta-papilomavírus, gama-papilomavírus) compartilham uma identidade de nucleotídeos de seus genomas menor que 60%; diferentes espécies (alfa-1, alfa-2, alfa-3) dentro de um mesmo gênero compartilham identidades entre 60% e 70%; um novo tipo de HPV apresenta menos de 90% de identidade quando comparado a qualquer outro tipo de HPV já caracterizado (de Villiers et al., 2004; Bernard et al., 2010). No grupo de pesquisa em papilomavírus convencionou-se que, isolados de um mesmo tipo de HPV, são referidos como subtipos quando a sequência nucleotídica da região *L1* difere entre 2% e 10%. Em um nível taxonômico ainda mais refinado, análises filogenéticas têm definido como linhagens de um mesmo tipo (anteriormente designadas como variantes), genomas que apresentam diferenças entre 1% e 2% e sublinhagens de um mesmo tipo, quando apresentam diferenças entre 0,5% e 1%. Este critério para determinação da taxonomia de HPV tem-se provado extremamente útil para pesquisadores de base, clínicos, epidemiologistas e imunologistas (Burk et al., 2013).

Os papilomavírus são espécie-específicos, infectando diversas aves, mamíferos e répteis (Bernard et al., 2010). Atualmente, mais de 200 tipos de HPV são reconhecidos, sendo que cada um apresenta tropismo próprio, particular para sítios anatômicos específicos (Cerdeira et. al. 2009). Em humanos, são subdivididos em 120 tipos distribuídos em cinco gêneros: *Alphapapillomavirus*, *Betapapillomavirus*, *Gammapapillomavirus*, *Mupapillomavirus* e *Nupapillomavirus* (Bernard et al., 2010). Estes ainda são subdivididos

em tipos de baixo e alto risco conforme seu potencial oncogênico (Doorbar, 2005; Chung et al., 2014; Saulle et al., 2015).

As origens históricas do HPV remontam à Grécia Antiga onde existem relatos do aparecimento de lesões, nomeadamente verrugas e papilomas. Nesta época, ainda não existia uma relação causal entre a presença de vírus e a presença destes tipos de lesões (Oriel, 1971). A ideia de que estas lesões poderiam estar relacionadas com a presença de vírus foi proposta pela primeira vez por Richard Shope em 1933. Estava assim estabelecida a primeira associação entre a presença de um vírus de DNA e o desenvolvimento de câncer (Flint et al., 2009). No entanto, apesar das descobertas efetuadas sobre este vírus com a implementação do exame de Papanicolau, foi apenas a partir da década de 70 que este começou a ser mais conhecido, quando Harold Hausen verificou que as verrugas e condilomas genitais em humanos poderiam ser provocadas por um Papilomavírus. Iniciou assim, um longo caminho no estudo deste vírus e na sua associação com o desenvolvimento de diferentes tipos de cânceres (Nakagawa et al., 2010). As lesões benignas, como verrugas genitais, são causadas pelos de baixo risco, como por exemplo, HPV 6 e 11, enquanto lesões potencialmente malignas ou lesões malignas, ocasionando câncer em diferentes locais, estão associadas aos de alto risco, como por exemplo, HPV 16 e 18 (Doorbar, 2005; Chung et al., 2014; Saulle et al., 2015).

A infecção por HPV inicia-se quando uma partícula viral entra nas células basais indiferenciadas do epitélio, após trauma ou erosão do mesmo. Como as células basais têm uma elevada capacidade de proliferação, o vírus utiliza os mecanismos de replicação da célula hospedeira para replicar o DNA viral. No núcleo das células basais, o DNA viral é replicado inicialmente em baixo número – 10 cópias por célula, aproximadamente – e apenas os genes precoces (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) são transcritos (Rampias et al., 2014; Rautava & Syrjanen, 2012). Os genes precoces codificam tanto proteínas de regulação como oncoproteínas. As células basais diferenciam-se conforme vão se deslocando da membrana basal para a superfície epitelial, o que significa que já não sintetizam DNA. No entanto, o vírus mantém as células, agora suprabasais, num estado em que a replicação de DNA viral continue a ser possível, o que leva a um elevado número de cópias (Rampias et al., 2014). A replicação em número mais elevado – mais de 1000 cópias por célula – leva à expressão dos genes tardios (L1 e L2), que codificam as proteínas estruturais e à produção de partículas virais maduras, que são libertadas nas camadas mais superficiais do epitélio em que as células já se encontram diferenciadas (Oliveira et al., 2003; Rautava & Syrjanen, 2012) e inicia-se uma nova infecção (Woodman et al., 2007). Estudos sugerem que a replicação do vírus depende do grau de

diferenciação dos queratinócitos (Braakhuis et al., 2009). HPVs de baixo risco, geralmente, só replicam nas camadas mais inferiores do epitélio estratificado, quando os queratinócitos estão passando por divisão celular. Por outro lado, os HPVs de alto risco replicam nas camadas mais altas do epitélio, quando os queratinócitos estão em diferenciação terminal. No entanto, os HPVs de alto risco são capazes de causar replicação em condições não habituais (Oliveira et al., 2002).

O potencial oncogênico do HPV é dependente do comportamento do genoma viral na célula hospedeira (Ferraz et al., 2012; Boccardo, 2010). Por sua vez, a progressão maligna usualmente representa uma morte biológica para o vírus, não sendo parte do ciclo vital normal do vírus (Wong & Münger, 2000). Células infectadas com HPV de baixo risco conservam-se com o genoma viral epissomal. Já nas células infectadas com tipos de alto risco, com a persistência da infecção, algumas células passam a ter o genoma viral integrado, embora alguns locais sejam sugeridos na literatura, este processo ocorre ao acaso, sem preferência por um sítio específico do DNA, nem do vírus e nem do hospedeiro (Ferraz et al., 2012; Boccardo, 2010). A progressão da fase de incubação para a de expressão, ou infecção produtiva, quando o DNA viral, que antes era circular, passa a ser linear, se incorporando ao DNA da célula hospedeira (Albring et al., 2006; St Guily et al., 2011), depende, dentre outros fatores, da permissividade celular, do tipo de vírus, do estado imunológico do hospedeiro, dos fatores exógenos e da co-morbidade, ou seja, da presença de uma doença ou condição que não se relaciona diretamente com a enfermidade, mas pode influenciar no desenvolvimento da mesma (Soares et al., 2007; Quintero et al., 2013; Daley et al., 2014). No entanto, quando a infecção se torna produtiva e o genoma do vírus é clivado na região E2 (Rautava & Syrjänen 2012), a integração do genoma viral pode conferir vantagem adaptativa às células infectadas. E2 é um fator de transcrição que conserva a atividade da LCR baixa e, quando sua expressão é perdida ou inibida, a expressão de E6 e E7, controlada pela LCR, aumenta. Quando isso ocorre, as células infectadas com DNA viral integrado apresentam maior chance de imortalização e proliferação descontrolada (Jeon & Lambert, 1995).

A proteína E6 do HPV está localizada quer no núcleo quer no citoplasma dos queratinócitos infectados e a sua função melhor caracterizada é a sua capacidade de interferir com a regulação do ciclo celular através da interação com a p53 (Hebner & Laimins, 2006). E6 é uma oncoproteína viral que coopera com a ubiquitina ligase E6-AP para se ligar à p53 levando à sua degradação através da proteólise dependente da ubiquitina (Scheffner et al., 1990, Sousa et al., 2007). A proteína supressora tumoral p53 tem três funções fundamentais (parada do ciclo celular, ativação da reparação do DNA e regulação da apoptose) atuando

como “o guardião do genoma”, e quando as células têm danos graves ou irreparáveis no DNA, ativa a parada do ciclo celular e induz reparação do DNA ou apoptose, evitando que as células progridam no ciclo celular com mutações genéticas. A degradação desta proteína resulta numa redução dos seus níveis, diminuindo assim as restrições do ciclo celular do DNA e permitindo que as células continuem a proliferar. A inativação funcional da p53 pela proteína E6 atua de forma semelhante a qualquer mutação no gene *p53* que pode afetar as funções normais da p53, o que de fato explica a importância do HPV na regulação do ciclo celular e na progressão maligna (Sousa et al., 2007).

Outra função importante da proteína E6 é a sua capacidade de impedir o encurtamento dos telômeros nas células epiteliais, pela ativação da subunidade catalítica da enzima telomerase (hTERT), uma enzima importante para a manutenção das estruturas teloméricas na extremidade dos cromossomos (Stoppler et al., 1997). A atividade da telomerase é detectada em mais de 90% das células imortalizadas e cancerígenas, mas está ausente na maioria das células somáticas normais (Kim et al., 1994), sugerindo que a ativação da telomerase é um evento importante durante o processo de imortalização e transformação maligna (Veldman et al., 2001). A ausência da atividade da telomerase em células normais resulta na perda progressiva dos telômeros em cada ciclo celular devido à finalização incompleta da replicação do DNA linear (Harley et al., 1990), que leva à instabilidade cromossômica e à senescência celular. Deste modo pensa-se que a diminuição dos telômeros representa um “relógio mitótico” que determina o tempo de vida de uma célula normal. A atividade da telomerase está intimamente relacionada com a expressão da sua subunidade catalítica, hTERT. Estudos mostraram que a atividade da telomerase pode ser induzida nos queratinócitos humanos pela expressão da oncoproteína E6, ela é capaz de transativar o promotor *hTERT*, indicando que o mecanismo de aumento da expressão da hTERT, mediado por esta oncoproteína, ocorre predominantemente ao nível da regulação da transcrição, embora seja possível que outros mecanismos, como a estabilidade do RNA ou processamento, podem fornecer a sua contribuição na ativação da telomerase (Veldman et al., 2001).

Por sua vez, a proteína E7, ao ligar-se à pRb, impede que a função reguladora desta proteína seja exercida. A pRb, na sua forma não fosforilada, ao formar um complexo com o fator de transcrição E2F, impede o avanço do ciclo celular para a fase S, sempre que necessário. Na progressão para a fase S, as cinases dependentes de ciclinas (CDKs) fosforilam a pRb, levando à libertação de E2F, o que permite a transcrição de genes envolvidos na síntese de DNA e proliferação celular. A E7, por sua vez, conecta-se à forma não fosforilada da pRb, e interfere com a sua função de regulação do ciclo celular, condicionando a sua

ligação ao fator de transcrição E2F, o que possibilita a ativação constitutiva dos genes alvo envolvidos na progressão do ciclo celular. A supressão da pRb pela E7 resulta na expressão aumentada da p16, um inibidor da cinase dependente de ciclina (Mendelsohn et al., 2010; Francis et al., 2013).

A proteína E5 tem a capacidade de aumentar a imortalização celular promovida por E6/E7 (Stöppler et al., 1996). A expressão de E5 induz uma gama de alterações celulares, incluindo aumento da sinalização por fatores de crescimento, ativação da via de *MAPK* (proteína quinase ativada por mitógenos) (Crusius et al., 1997), e alcalinização de endossomas (Straight et al., 1995). Estes mecanismos são responsáveis por desencadear alterações do tráfego no interior dos compartimentos endossomais, potencialmente interferindo com a apresentação de antígenos virais (Zhanget al., 2003), e alterando significativamente a habilidade de células infectadas pelo HPV escaparem do sistema imune (Disbrow et al., 2005). A proteína E5 interage com os receptores dos fatores de crescimento – EGFR, PDGFR e CSF-1R – e estimula a proliferação celular, inibindo, simultaneamente, a apoptose após lesão do DNA, desempenhando, aparentemente, um importante papel apenas na fase inicial da infecção. De fato, à medida que as lesões associadas à infecção por HPV progredem até o câncer, o DNA viral é incorporado no genoma da célula hospedeira e uma parte substancial do material genético viral sofre deleção, incluindo a sequência codificadora da E5 (Rautava & Syrjänen 2012; Feller et al., 2013).

Há a hipótese de que os tipos de HPV considerados de “baixo risco” não provoquem malignização devido à fraca ligação de E6 e E7 às proteínas alvo, mas também devido a diferenças na posição do promotor, na regulação e união do RNA mensageiro comparativamente a tipos de HPV de “alto risco” (Chung et al., 2014).

A participação do HPV na tumorigênese tem sido descrita mais detalhadamente na patogênese dos tumores do colo de útero (Betiol et al., 2013). No entanto, quando se trata de CECP, estudos têm mostrado que o HPV ainda não tem sua participação bem estabelecida (Ferraro et al., 2011).

Nos últimos anos, a participação do HPV na patogênese dos tumores de cabeça e pescoço tem sido sugerida em vários estudos, sobretudo relacionada ao carcinoma de células escamosas de orofaringe (Combes & Franceschi, 2014; Zaravinos, 2014). Embora os tumores HPV+ sejam mais comumente encontrados dentro da orofaringe, eles também foram encontrados ao longo de cada local do trato aerodigestivo superior (Gillison et al., 2000).

Stina Syrjanen, em 1983, foi a primeira a apresentar a hipótese que implica o HPV na etiologia do CECP (Sudhoff et al, 2011). Esta hipótese, desde então, 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 detecção de genótipos de HPV de alto risco em amostras de carcinoma das células escamosas orais (Pannone et al., 2011).

Na última década houve uma redução no consumo de tabaco (Globocan, 2012), no entanto, não foi observada redução na incidência dos CECPs. Pelo contrário, tem sido observado um aumento na incidência dos tumores de orofaringe nos últimos 20 anos, o que pode estar relacionado à infecção pelo HPV (Chaturvedi et al., 2013). Outro aspecto que tem atraído a atenção nos últimos anos é a mudança no perfil dos indivíduos com CECP, com aumento na incidência de tumores em indivíduos mais jovens, com idade inferior a 45 anos, sem história de consumo de álcool e tabaco. A relação homem/mulher afetados pela doença é de 3:1 (Westra, 2009), entretanto as taxas de incidência relacionadas à infecção pelo HPV vêm aumentando entre a população de adultos jovens em ambos os sexos, sobretudo em carcinoma de células escamosas de orofaringe (INCA, 2017). Em alguns países desenvolvidos uma das razões para o aumento dos cânceres orofaríngeos positivos para o HPV, é a hipótese de ser em parte devido a mudanças no comportamento sexual oral (Kurdgelashvili et al., 2007).

A infecção por HPV pode não estar sempre envolvida nos CECPs, (Pyrri & DiMaio, 2008) pelo fato que a transformação tumorigênica de células epiteliais pode ser induzida por HPV de alto risco apenas quando o DNA viral está integrado no genoma da célula hospedeira. (Ling et al., 2009; Ciesielska et al., 2012).

Um grande número de pesquisas discute a conversão maligna de CECPs relacionados ao HPV, os primeiros reportes datando de 1940 (zur Hausen, 1977). Embora o DNA genômico do HPV tenha sido detectado em CECP, seu papel etiológico no desenvolvimento desse tipo de câncer tem permanecido obscuro (Gillison et al., 2000). Estudos recentes têm revelado um papel importante e intrigante para o HPV em CECP (Hennessey, Westra et al., 2009; Syrjänen et al., 2011), as análises genéticas apontam para uma classe completamente distinta de carcinoma (Braakhuis et al., 2009; Syrjänen et al., 2011). O perfil do paciente HPV+ difere do HPV- em vários aspectos significativos, incluindo o teor molecular do tumor, história sexual do paciente, ausência de fatores de risco clássicos e prognóstico clínico (van Monsjou et al., 2010; Zushi et al., 2011).

Ao menos três grupos distintos de CECPs podem ser assinalados: 1) tumores que contém o HPV transcricionalmente ativo (em grande parte proveniente de orofaringe, *p53* selvagem, positivos para mRNA de *E6* e *E7* e com um prognóstico favorável); 2) tumores HPV- com alta instabilidade cromossomal (grande número de alterações numéricas, principalmente aneuplóide e *p53* mutado e de pior prognóstico); 3) tumores HPV- com baixa instabilidade cromossomal (poucas alterações numéricas, quase diplóides, *p53* selvagem e com um prognóstico possivelmente favorável) (Leemans et al., 2011).

Um paciente com carcinoma HPV+ apresenta uma série de características individuais, tais como ser de raça caucasiana, não tabagista, não etilista, idade entre 40 e 59 anos, com historia de múltiplos/as parceiros/as sexuais, e estatuto socioeconômico elevado (Pytynia et al., 2014; Dahlstrom et al., 2015;). Porém, alguns autores associam este tipo de carcinoma a um estatuto socioeconômico baixo (Orosco et al., 2016).

Em 2005, Kreimer et al. revisaram estudos publicados entre 1990 e 2004 relatando a prevalência e distribuição de genótipos de HPV por sítio anatômico em 5.046 tumores de cabeça e pescoço. Foi observada uma prevalência de HPV de 23,5% nos tumores orais, 35,6% nos tumores de orofaringe e 24% nos tumores de laringe.

Um problema levantado na revisão de Mirghani et al. (2015a) é que apesar de haver classificações standartizadas, muitos estudos falham na classificação das diferentes localizações anatômicas, como classificar a base da língua no mesmo grupo que a língua móvel, quando a base da língua se classifica como orofaringe. Esta má classificação pode levar a valores sobrestimados de DNA viral em localizações não orofaríngeas, como a cavidade oral e, conseqüentemente, a uma má compreensão da verdadeira prevalência do vírus nos diferentes locais anatômicos (Fakhry et al., 2014; Mirghani et al., 2015a).

A maioria dos estudos que analisaram a associação entre linhagens moleculares de HPV e o risco de persistência viral e desenvolvimento de tumor foram realizados em câncer de colo uterino (Sichero et al., 2007; Schiffman et al., 2010), poucos estudos deste tipo foram conduzidos em amostras de cabeça e pescoço. Nos Estados Unidos, uma notável similaridade foi observada na distribuição de diferentes linhagens de HPV-16 em amostras de tumores de células escamosas de cabeça e pescoço quando comparadas à distribuição relatada para tumores cervicais. Dentre 253 amostras provenientes de tumores de cabeça e pescoço, foi observada a presença do DNA de HPV em 25% (62/253) destas, sendo o DNA de HPV-16 presente em 90% destes tumores positivos. Os isolados foram alocados na linhagem Europeia (75%), Asiática (17%), Norte-Americana (4%) e Africana (4%) (Gillison et al., 2000).

Dayyani et al. publicaram uma metanálise no ano de 2010 que analisou 34 estudos e encontrou uma prevalência de 21,95% do HPV em CECP. Representando 86,69% de todos os casos HPV+. O tipo viral mais encontrado foi o HPV-16, apesar da predominância do HPV-16 nos CECPs, uma análise de amostras de raspado oral revelou a presença de um amplo espectro de tipos de HPV (Bottalico et al., 2011).

As taxas de detecção do DNA de HPV em CECPs são altamente variáveis, sendo esta notável amplitude de prevalência viral entre os estudos atribuída a fatores como: agrupamento de lesões provenientes de sítios anatômicos distintos, pequeno número de amostras, origem etnogeográfica dos indivíduos analisados e diferenças das técnicas de conservação das amostras (Betiol et al., 2013). Adicionalmente, as metodologias de detecção viral utilizadas podem influenciar a prevalência viral mensurada em um grupo de amostras (Shi et al., 2009).

A região da cabeça e pescoço é o segundo local mais comum de tumores HPV+, os quais tendem a ter grande envolvimento nodal e pequeno estágio tumoral. Como consequência, a maioria dos pacientes com CECP HPV+ são diagnosticados em estágios clinicamente avançados. No entanto, eles também tendem a ser menos propensos a desenvolver malignidades secundárias (Pajares et al., 2014). Clinicamente, os CECP HPV+ são tipicamente associados com estado geral avançado do tumor, o que se deve principalmente ao aumento do envolvimento ganglionar. Surpreendentemente, estes tumores demonstraram consistentemente um prognóstico melhorado em relação ao HPV-. A disparidade entre os efeitos celulares do HPV e os resultados clínicos ainda não é clara (Li et al., 1994).

2.1.3 HPV e carcinoma de cabeça e pescoço

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 685 mil pessoas, entre a população sexualmente ativa, são infectadas pelo HPV a cada ano (Okada, 2000). As infecções pelo vírus ocorrem em todo o mundo, sendo relativamente comuns, acometendo ambos os sexos (Hubbard, 2003). A prevalência da infecção e a distribuição dos tipos variam em diferentes países e, dentro do mesmo país, nas diferentes regiões. Desse modo, a epidemiologia da infecção necessita ser avaliada em cada região (Castellsaqué et al., 2001).

2.1.3.1 Transmissão

O HPV é um vírus epiteliotrópico que afeta as células epiteliais escamosas queratinizadas (pele) e não queratinizadas (mucosa oral, faringe, laringe e zonas genitais). (Doorbar, 2005). É transmitido através de contato, quer seja genital-genital ou oral-genital (Chung et al., 2014; Rettig et al., 2015), fômites (Barbosa Filho et al., 2010) e há evidência de que a transmissão vertical seja possível: durante o parto a boca da criança pode entrar em contato com o meio vaginal infectado da mãe, levando, conseqüentemente, à infecção oral por HPV na criança (Chung et al., 2014; Rintala et al., 2005).

Segundo Chung et al. (2014), há maior incidência de câncer orofaríngeo em parceiros de mulheres com câncer do colo do útero, comparativamente à população em geral, o que suporta a transmissão do vírus de genitais infectados por HPV de uma mulher para a cavidade oral do seu parceiro durante o sexo oral. Relativamente à prevalência de HPV oral, observa-se que a prevalência oral de HPV é mais elevada em indivíduos do sexo masculino, sendo que, segundo D'Souza et al. (2014), existe uma maior incidência de HPV oral em homens heterossexuais que em homens homossexuais, sustentando a hipótese que o risco de transmissão é maior através de sexo oral em mulheres que sexo oral em homens. Além disso, no estudo realizado pelos mesmos autores, verificou-se também uma incidência maior em mulheres não heterossexuais e uma incidência menor em homens homossexuais.

O número de parceiros sexuais e a idade da primeira relação sexual vaginal ou oral influenciam também a presença ou não do vírus em certos indivíduos. A prevalência da infecção é superior em indivíduos que têm a sua primeira relação sexual oral com 18 anos ou com idade inferior (Gillison et al., 2012).

A infecção persistente por HPV é o evento fundamental para que ocorra transformação celular. De uma forma geral, este agente vírico tem a capacidade de induzir infecções crônicas, desprovidas de sequelas sistêmicas evidentes, o que indica que, de alguma forma, subverteu os mecanismos de defesa do hospedeiro, nomeadamente aqueles que pertencem à imunidade inata e adquirida. O ciclo do HPV e o fato de decorrer, exclusivamente, de forma intra-epitelial são pontos-chave para a compreensão da estratégia adotada por este agente para escapar à resposta imunitária. Inicialmente, a infecção viral não é acompanhada por inflamação, sendo que a ocorrência deste evento iria ativar a imunidade inata; em acréscimo, o HPV não é um vírus lítico, mas sim lisogênico, e o seu ciclo vital ocorre em queratinócitos, havendo montagem e replicação viral naqueles que se encontram diferenciados e, portanto, que já terão sido submetidos, previamente, a um mecanismo regulatório e de apoptose. Outra característica do HPV que permite a sua evasão ao sistema imunitário do hospedeiro é o fato de só existir expressão viral dos genes e consecutivamente das oncoproteínas nos

queratinócitos, ou seja, não há síntese de proteínas virais em células apresentadoras de antígenos. Por fim, mas não menos importante, o HPV provoca pouca ou nenhuma virêmia, já que a inoculação deste agente acontece em interrupções epiteliais, mas com a manutenção da integridade da camada basal, deixando, de igual forma, um acesso escasso aos gânglios linfáticos. Em acréscimo aos baixos níveis de resposta imune perante infecção por HPV, é importante referir que o ambiente, estilo de vida, características genéticas do hospedeiro e do genoma viral podem influenciar a persistência do HPV e o desenvolvimento de patologias (Stanley 2009; Rautava & Syrjänen 2012).

A maioria das infecções por HPV são transitórias e assintomáticas, sem manifestações clínicas. Mais de 90% das novas infecções por HPV, incluindo aquelas com tipos de alto risco oncogênico, desaparecem ou tornam-se indetectáveis em dois anos, geralmente se manifestando nos primeiros 6 meses após a infecção. A infecção persistente com HPV de alto risco oncogênico é o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de lesões precursoras do câncer de células escamosas (Hariri et al., 2011).

2.1.3.2 Métodos de detecção e tipagem do HPV

O diagnóstico do papilomavirus é feito através da associação entre as manifestações clínicas do paciente, biópsias e exames laboratoriais (Lancellotti et al., 2000). Dentre as mais conhecidas técnicas de diagnóstico laboratorial do vírus, têm-se *Southern Blotting*, Hibridização in situ, Imunohistoquímica, Reação em Cadeia de Polimerase (PCR), os quais se mostram como métodos eficientes para a detecção do mesmo. Com a incidência de infecções múltiplas e a diversidade dos genótipos, torna-se necessário o estabelecimento de métodos confiáveis para identificação dos vários tipos virais, não somente para estudos epidemiológicos como também para o acompanhamento de pacientes (Didelot-Rosseau et al., 2006). Vários métodos têm sido descritos para identificar os diferentes tipos do vírus (Carmo e Fiorini, 2007; Carestiato et al., 2006), como a PCR com iniciadores genéricos e a técnica de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) (Molijn et al., 2005).

A PCR é a técnica mais utilizada (Adelstein e Rodriguez, 2010), pois apresenta uma maior sensibilidade (Chaudhary et al., 2009) permitindo a amplificação de sequências de DNA específicas mesmo quando a sua presença é extremamente baixa (Kindt et al., 2008).

A participação do HPV no CECP, de forma geral, tem sido intensamente estudada nos últimos anos. No entanto, as taxas de detecção do DNA viral são bastante variáveis, dependendo do método de detecção utilizado (Gravitt et al., 2000). Como os HPVs não

podem ser cultivados em tecidos ou animais de laboratório, quase todos os métodos atualmente utilizados para sua detecção assentam na avaliação dos ácidos nucleicos virais, majoritariamente o DNA. Contudo, atualmente, não existe unanimidade no que concerne ao método mais adequado para a detecção desta entidade vírica nos CECPs (Snijders et al., 2010; Poljak 2012). Para além da técnica de detecção e localização anatômica, o modo de obtenção e conservação da amostra também influencia os resultados dos estudos Lajer & von Buchwald, 2010; Ramqvist & Dalianis, 2010).

2.1.3.3 Prevenção

Tendo em conta a incidência crescente de carcinomas HPV+ e em camadas mais jovens, é imperativo que haja medidas de prevenção (Enomoto et al., 2016). A prevenção do câncer de etiologia viral abrange prevenção primária, com a educação sobre fatores de risco e vacinação, e prevenção secundária para promover a detecção precoce do processo patológico (Kreimer, 2014).

O desenvolvimento da vacina profilática contra os tipos oncogênicos do HPV foi um dos avanços científicos mais importantes nos últimos anos (Galani & Christodoulou, 2009). As vacinas contra o HPV surgem como agentes cooperadores para uma maior cobertura e prevenção das complicações decorrentes da infecção pelo HPV. Elas têm como finalidade combater a disseminação do vírus e o controle das lesões por HPV. Autores apontam que as vacinas para o HPV previnam além do câncer cervical, outros tipos de cânceres relacionados ao HPV com eficácia de moderada a alta (Natunen et al., 2011).

No Brasil foram aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) duas vacinas profiláticas. A vacina bivalente da Glaxo Smith Kline (2009) e a quadrivalente da Merck Sharp e Dohme (2006) (Harper & Vierthaler, 2011; Brasil, 2013b). Ambas são não infecciosas e não oncogênicas (Roteli-Martins et al., 2012), a bivalente previne as infecções pelos subtipos 16 e 18, e a quadrivalente aquelas causadas pelos subtipos 6, 11, 16 e 18 (Harper & Vierthaler, 2011; Brasil, 2013b).

Entre dezembro de 2014 e junho de 2015, foi concedida a autorização de comercialização nos EUA e na Europa de uma nova vacina nonavalente contra o HPV. Ela foi desenvolvida a partir da vacina quadrivalente e inclui cinco tipos adicionais de HPV (31, 33, 45, 52 e 58) que devem aumentar o nível de proteção contra cânceres relacionados ao HPV, melhorando assim o impacto global dos programas de vacinação (Lopalco, 2016).

As vacinas são direcionadas para a proteína L1, e estas estimulam a produção de anticorpos neutralizadores específicos para essa proteína da cápside viral (Kreimer, 2014; Pytynia et al., 2014). Os níveis de anticorpos decrescem um *log* entre a última dose e os 18 meses depois da vacinação, sendo que depois estabilizam, mantendo-se tão ou mais altos que os níveis de anticorpos obtidos após infecção natural por aproximadamente cinco anos (Cutts et al., 2007). Porém, a concentração mínima de anticorpos para que se consiga proteção eficaz contra o vírus ainda não é conhecida (Cutts et al., 2007; Herrero et al., 2015).

Para maior eficácia, é recomendado que a vacinação seja feita antes do início da vida sexual, o que supõe que não tenha havido qualquer contato com o vírus antes (Kreimer, 2014; Castle & Maza, 2016), uma vez que esta não tem indicação para tratar infecções já estabelecidas antes da vacinação e estas serem vacinas profiláticas (Fakhry & D'Souza, 2013). Apesar destas vacinas protegerem contra a maior parte das infecções por HPV, cerca de 70 a 80%, é importante lembrar que os outros tipos de HPV continuam a apresentar risco de desenvolver doença relacionado com o vírus (Kumar & Biswas, 2015).

Como benefício indireto da vacinação, surge a imunidade de grupo, em que ao imunizar grande parte de uma população está-se a reduzir o risco de infecção dos indivíduos não vacinados dessa mesma população (Alam & Rahman, 2016). Em um estudo realizado na Austrália, país onde a vacina quadrivalente para adolescentes está introduzida no seu programa nacional de vacinação desde 2007, foi examinada a prevalência dos tipos de HPV abrangidos pela vacina – 6, 11, 16 e 18 – em homens heterossexuais sexualmente ativos de 2004 a 2015. Foi observada uma redução da prevalência dos tipos abrangidos na vacina quadrivalente em homens nascidos na Austrália não vacinados, o que sugere que possa ter havido um efeito de imunidade de grupo através do programa de vacinação feminino. Também foi observada uma redução dos tipos 16 e 18 – mas não dos tipos 6 e 11 – em homens nascidos no estrangeiro cujos países tinham a vacina bivalente implementada nos seus programas nacionais de vacinação, querendo dizer que esses indivíduos possam ter tido um efeito de imunidade de grupo através das suas parceiras no país natal. O que pode querer dizer que há a possibilidade de uma redução da incidência de tumores associados ao HPV em homens, mesmo em países em que o programa de vacinação para o HPV apenas abranja indivíduos do sexo feminino (Chow et al., 2016). Castle e Maza (2016) afirmaram que países em que a vacinação profilática foi implementada antes de 2010 já demonstram uma redução na prevalência de infecção em mulheres por tipos de HPV abrangidos nas vacinas e mostram imunidade de grupo nos homens. Para além do mais, a vacinação generalizada poderia

controlar e evitar os riscos do HPV, incluindo lesões benignas e malignas em diferentes partes do corpo (Chattopadhyay et al., 2015).

No Brasil, a vacina contra o HPV foi incluída no Programa Nacional de Imunizações (PNI) do Sistema Único de Saúde (SUS) em 2014. A vacina distribuída no SUS é a quadrivalente, que previne contra quatro tipos de HPV (6, 11, 16 e 18). A população alvo da vacinação contra o HPV é composta por adolescentes do sexo feminino na faixa etária entre 11 e 13 anos de idade no ano da introdução da vacina (2014), na faixa etária de 9 a 11 anos no segundo ano (2015) e de 9 anos de idade do terceiro ano em diante (2016) (Brasil, 2013b). Em 2017 a vacina tem como alvo adolescentes do sexo feminino, na faixa etária de 9 a 14 anos de idade e adolescentes do sexo masculino na faixa etária de 12 a 13 anos de idade, até 2020, a faixa etária masculina será ampliada gradativamente para adolescentes a partir de 9 anos de idade (Ministério da Saúde, 2016).

Apesar da implementação da vacinação contra o HPV em diversos países, muitos são os indivíduos não abrangidos pelos programas nacionais de vacinação. Para além de os indivíduos do sexo masculino não serem incluídos na vacinação em quase todos os países, indivíduos de ambos os sexos nascidos em anos fora do estipulado também se encontram desprotegidos. Ao não serem incluídos pelos programas de saúde, o custo do sistema de vacina é totalmente suportado pelo próprio, sendo esse um dos motivos pelos quais esses indivíduos decidem não serem vacinados. Outras razões incluem o desconhecimento da vacina ou suas indicações e preocupação com efeitos secundários e eficácia (D'Souza et al., 2014).

Uma possível maneira de prevenção do CECP é através da vacinação contra HPV, que apesar de indicada para prevenção do câncer do colo do útero, poderá também prevenir o desenvolvimento de câncer em outros sítios anatômicos (Rettig et al., 2015). Teoricamente, a vacina seria igualmente eficaz para a prevenção do CECP, uma vez que se trata do mesmo vírus, mas em localizações anatômicas diferentes (Syrjanen, 2010). Um estudo de Herrero et al. (2013) mostra que a vacinação bivalente contra HPV de alto risco 16 e 18 diminui a prevalência de infecção oral nos indivíduos vacinados, com uma eficácia da vacinação estimada de 93,3%.

Nas últimas duas décadas houve um avanço nas pesquisas relacionadas à etiologia das lesões causadas pelo HPV (Bernard, 2004). No entanto, Castro et al (2014), afirmam que ainda há de se avançar muito para que haja adequado controle na incidência de infecções por HPV bem como avaliação rigorosa dos programas de prevenção baseados na vacinação contra o HPV. Se a vacina for comprovadamente eficaz contra os cânceres causados pelo HPV,

como resultados preliminares indicam para a infecção oral por HPV, uma proporção substancial de CECP poderá ser evitada (Ndiaye et al., 2014).

2.1.3.4 Tratamento

O diagnóstico do CECP baseia-se na avaliação física dos sintomas em conjunto com exames laboratoriais, que são de extrema importância na conduta terapêutica (Haddad et al., 2008). Em termos de tratamento não há diferenciação entre carcinomas HPV+ e carcinomas HPV-, sendo que a escolha do tipo de tratamento depende apenas do seu estadiamento (Marcu, 2016).

O tratamento dos CECPs pode passar por cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou a conjugação das mesmas (Benson et al., 2014). A cirurgia tem como objetivo a remoção do tumor primário e o esvaziamento ganglionar (Chambers et al., 2005). Na radioterapia, a radiação é utilizada para eliminar o tumor ou impedir o crescimento tumoral (Marcu, 2016). A quimioterapia, por sua vez, diminui o volume do tumor e minimiza o risco de recidivas (Budach, 2010; Chambers et al., 2005). A abordagem multidisciplinar terapêutica depende de alguns fatores como, sítio primário, estágio da doença e preservação do órgão atingido. Ambos os critérios são baseados em diretrizes internacionais como ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*), que avaliam o impacto da doença e do tratamento nas habilidades do paciente. Pacientes classificados em estágios iniciais da doença são potencialmente tratados com cirurgia ou radiação, entretanto, pacientes em estágios avançados requerem uma elaborada multimodalidade terapêutica que consiste na combinação entre cirurgia, quimioterapia e radioterapia (Haddad et al., 2008).

O CECP impacta no funcionamento do trato aerodigestivo superior e afeta a qualidade de vida dos pacientes (Galbiatti et al., 2013). O prognóstico dos pacientes com CECP tem melhorado nos últimos anos. Considerando-se todas as localizações de CECP, estudos mostram resultados atingindo taxas de sobrevivência em torno de 50% no período de cinco anos após o diagnóstico. O melhor prognóstico da doença depende primeiramente da localização anatômica, seguido de fatores como o estágio do tumor, *status* de HPV e outros fatores clínicos e patológicos (Rettig & D'Souza, 2015).

Uma das características do câncer HPV positivo é o bom prognóstico comparativamente com o carcinoma não relacionado ao HPV, independentemente da idade e sexo do paciente, diferenciação do tumor, envolvimento nodular ou terapêutica optada (Marklund & Hammarstedt, 2010). Os mecanismos que levam a este melhor prognóstico

ainda não são totalmente compreendidos (Nagel et al., 2013; Thavaraj et al., 2014). Segundo observações tanto *in vitro* como *in vivo*, os carcinomas HPV+ aparentam ter uma melhor resposta às terapêuticas (Marcu, 2016), sendo mais radio e quimiossensíveis (Adelstein & Rodriguez, 2010; St Guily et al., 2011; Biron, O'Connell & Seikaly, 2013), contudo diferentes localizações anatômicas podem ter diferentes respostas ao tratamento (Marcu, 2016).

Existem várias hipóteses que tentam explicar o fato do câncer HPV+ ter melhor prognóstico em relação ao câncer HPV-, como o genoma do câncer HPV+ ser instável e/ou as células HPV+ sofrerem de hipoxia, podendo ser induzidas a apoptose mais facilmente; o fato de os carcinomas HPV+ terem menos mutações em *p53*, ao contrário dos carcinomas HPV-, porém, não há evidência suficiente que suporte estas explicações (Hong et al., 2016).

Há a sugestão que a resposta imunitária do hospedeiro contribua para esta melhor resposta: em estudos com ratos com CECPs HPV+ e HPV- sujeitos a radioterapia e a quimioterapia com cisplatina, ambas as terapias eliminaram os tumores HPV+, enquanto que os tumores HPV- não tiveram qualquer resposta; adicionalmente, ratos com imunodeficiência e com carcinomas HPV+ não tiveram uma boa resposta terapêutica como os ratos imunocompetentes, sugerindo que a resposta ao tratamento depende da capacidade dos agentes terapêuticos em induzir uma resposta imunitária contra as células tumorais HPV+ (Marcu, 2016).

Os pacientes com carcinoma HPV+ têm melhor taxa de sobrevivência e menor risco de recorrência que os pacientes com carcinoma HPV- (Syrjanen, 2010). Para além da baixa recorrência locoregional, há também uma incidência muito mais baixa de segundos tumores primários. A explicação para tal pode ser pela ausência de cancerização em campo, que é definida como a presença de alterações genéticas no epitélio em torno dos tumores, a partir das quais podem surgir novos tumores. Embora raros, a recorrência locoregional e o surgimento de segundos tumores primários podem ocorrer. Rietbergen et al., (2014) sugeriram a hipótese da migração de células infetadas do local do tumor primário para outros locais. Contudo, os mecanismos exatos ainda são desconhecidos e mais investigação é necessária. Metástases podem ocorrer à distância e surgir mais de dois anos após o tratamento inicial – ao contrário dos carcinomas HPV- cujas metástases podem surgir num período até 2 anos – o que leva à necessidade de controle apertado dos pacientes de carcinoma HPV+. No entanto, caso ocorram metástases, estas têm também melhor prognóstico que metástases de carcinomas HPV- (Pytynia et al., 2014).

O CECP relacionado ao HPV é um tumor distinto não suficientemente estadiado pelo sistema de estadiamento TNM (Ward et al., 2014). Pacientes com CECP HPV+ apresentam um melhor resultado para as opções de tratamento atual em comparação com o pacientes CECP HPV- (Brian et al., 2012), mas não se sabe a relação real entre HPV e os resultados do tratamento (Zhu et al., 2016).

Os tratamentos existentes atualmente para o CECP encontram-se frequentemente associados com o surgimento de efeitos adversos (Descamps et al., 2014). Assim, o maior objetivo do tratamento é curar o doente, minimizando os efeitos adversos associados à terapêutica e reduzindo, desta forma, a morbidade desta doença (Mirghani et al., 2015b). A busca por tratamentos oncológicos com maior seletividade celular e menores efeitos adversos fundamentam diversas pesquisas com o objetivo de alcançar novas alternativas terapêuticas (Freudlsperger et al., 2011).

A ausência de sinais relativos à presença de CECP que permitam identificar a patologia num estado precoce reforça a necessidade de se utilizar biomarcadores de elevada especificidade e sensibilidade em pacientes de alto risco, minimizando assim, as taxas de morbidade e mortalidade (Goon et al., 2009).

Muitos tumores que ocupam o mesmo sítio anatômico e apresentam estágio semelhante, muitas vezes respondem de forma muito variada ao tratamento. Sendo assim, o estudo de biomarcadores que indiquem a progressão tumoral ou possam prever a resposta ao tratamento tem sido amplamente explorado. Desta forma, busca-se um tratamento mais individualizado, evitando o emprego de terapias muito agressivas para casos que apresentam bom prognóstico, reduzindo assim as complicações decorrentes do tratamento antineoplásico. Por outro lado, procura-se intensificar o tratamento em tumores cujo comportamento biológico mostra-se mais agressivo, aumentando as chances de cura e a sobrevida dos indivíduos (Ang et al. 2010).

2.1.4 Biomarcadores

A identificação do prognóstico das neoplasias malignas se tornou um dos maiores desafios da medicina moderna. Sua detecção precoce é a principal estratégia na prevenção e controle deste tipo de doença, permitindo que intervenções e terapias efetivas possam contribuir para a redução da mortalidade e morbidade por câncer.

Definir o prognóstico e o risco de desenvolvimento, assim como o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constituem a

principal razão para a identificação de marcadores biológicos ou biomarcadores. Os biomarcadores tumorais são indicadores de alterações que ocorrem durante o processo neoplásico e do estado fisiológico (Srinivas et al., 2001), eles são indicativos bioquímicos da presença de um tumor. As células tumorais ou outras células do organismo podem produzir estas substâncias em resposta à presença do câncer. A aferição qualitativa e quantitativa dos marcadores tumorais pode ser feita no sangue, urina, tecidos ou em outros fluidos corpóreos (Diamandis et al., 2002).

A expressão destes marcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais, tais como hiperproliferação, alteração de padrões de expressão gênica, hiperplasia, genotoxicidade, inflamação e alterações enzimáticas relacionadas com o desenvolvimento tumoral, entre outros (Srinivas et al., 2001).

Principalmente nos estádios iniciais, nem todos os portadores de câncer têm marcadores tumorais alterados, alguns em condições benignas, têm aumento dos valores destas substâncias. Além disso, o mesmo marcador tumoral pode estar elevado em diferentes tipos de câncer (NCI, 2016).

Um biomarcador tumoral ideal possui relação direta com o processo maligno, correlaciona-se com a massa tumoral, permite a caracterização do tipo de tumor, a localização, o estadiamento do tumor, bem como fornece uma avaliação prognostica do tumor em questão (Srinivas et al., 2001).

Pensa-se que a terapêutica para CECV na presença e na ausência de HPV deve ser vista de forma diferente, dado existirem diferenças significativas nos dois cânceres (Kim et al., 2015). A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes a esta doença é fundamental para o desenvolvimento de terapias específicas e individualização do tratamento baseado na biologia do tumor. Nos últimos anos, a área da proteômica tem sido muito investigada, conduzindo à identificação de proteínas específicas que são expressas de modo diferencial em vários tipos de tumores (Descamps et al., 2014).

2.1.4.1 p16

O gene *CDKN2*, também referido como *INKA4*, é um gene supressor de tumor, localizado no cromossomo humano 9p21, este gene codifica uma proteína de 156 aminoácidos, designada p16 (Todd et al., 2002; Romana, 2010; Serrano et al., 2012). A proteína p16 regula negativamente a progressão do ciclo celular, atuando como inibidor de CDK 4/6 e, desta forma, bloqueando a fosforilação da proteína pRB. A pRB, por sua vez,

exerce efeitos antiproliferativos por meio do controle da transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Em sua forma ativa, hipofosforilada, pRb está ligada ao fator de transcrição E2F, bloqueando sua ação e mantendo a célula na fase G1. Quando fosforilada, a pRB torna-se inativa e libera o fator E2F, o qual induz a progressão do ciclo celular para a fase S (Ferraz et al., 2012; Pannone et al., 2012; Oguejiofor et al., 2013).

Desde que foi descoberta em 1993 (Serrano et al., 1993), estudos vêm demonstrando que a expressão da proteína p16 está frequentemente alterada em neoplasias humanas como melanomas, leucemias, linfomas e carcinomas de colo de útero, esôfago e pulmão, assim como nos CECPs. Alterações no cromossomo e seu *locus* podem promover anormalidades no gene, assim como variações na expressão da proteína celular dos diversos tumores acima descritos (Mortier et al., 2002; Ohta et al., 2009).

Deleções ou mutações do gene supressor de tumores p16 têm sido demonstradas em CECP, indicando a importância do gene no desenvolvimento dessa neoplasia (Perez-Ordoñez et al., 2006; Ohta et al., 2009). A perda funcional do p16 resulta na proliferação celular anormal pela remoção da chave no ponto de checagem do ciclo celular, o que permite que as células progridam para a fase S sem restrições. Uma relação recíproca tem sido vista entre expressão do p16 com a da pRb, sugerindo a presença de uma alça de controle de retroalimentação negativa que permite a pRb limitar a concentração de p16 (Gulley et al., 1998; Soni et al., 2005). O gene *INKA4* alterado participaria do estágio inicial da transformação neoplásica em carcinomas epidermóides, interferindo com a diferenciação terminal e levando a uma proliferação celular irrestrita (Ohta et al., 2009).

A ausência ou inativação da proteína p16 parece ser um evento precoce na carcinogênese, resultando em rompimento do controle do ciclo celular, com consequente desenvolvimento do tumor (Mortier et al., 2002; Pérez-Sayáns et al., 2011). Diversos estudos indicam que p16 se torna menos expresso à medida que aumentam as células envolvidas na atividade tumoral (El-Naggar & Westra, 2012).

p16 pode fornecer evidências do potencial maligno de uma lesão e sua superexpressão pode ser considerada um marcador de prognóstico favorável, afetando o comportamento clínico desses tumores (Liang et al., 2012; Lewis, 2012). Em uma avaliação do impacto de p16 na resposta ao reparo de danos no DNA em CECP, verificou-se que o p16 dificulta a resposta ao dano no DNA, independentemente da sua capacidade de inibir a atividade de CDK 4/6 ou de controlar a progressão do ciclo celular, e sensibiliza as células HPV+ para o tratamento de radiação (Dok et al., 2014).

Em células normais a transcrição de *INKA4* está epigeneticamente reprimida, entretanto em alguns tumores em humanos, principalmente aqueles causados por HPV de alto risco, a expressão de *INKA4* ocorre em altos níveis (McLaughlin-Drubin et al., 2013). A oncoproteína viral E7 inibe a atividade da pRB por ligar-se a esta proteína, liberando o fator E2F, desencadeando o processo de replicação do DNA e aumentando a proliferação das células do epitélio infectado. O gene *INKA4*, por sua vez, tem sua expressão controlada por *feedback* negativo exercido pela pRB. Assim, a inativação de pRB por E7 resulta no acúmulo de p16 nas células infectadas. (Ferraz et al., 2012; Pannone et al., 2012; Oguejiofor et al., 2013).

A alta expressão de p16 nos tumores benignos e associados ao HPV demonstra que essa proteína está possivelmente desempenhando seu papel na tentativa de interromper a proliferação tumoral, o que resultaria em melhor prognóstico para a doença (Wittekindt et al., 2012). Segundo Wittekindt et al (2012), o inibidor transcricional de p16 é a proteína pRb. Assim, nos tumores HPV+, a proteína pRb é inativada pela proteína E7 do HPV, o que resultaria em desrepressão de p16 e aumento da sua expressão.

Embora p16 possa não ser um marcador 100% específico da infecção pelo HPV, pode fornecer importantes informações prognósticas (Gültekin et al., 2015). Segundo Coordes et al. (2015), a sobrevivência do CECP é melhorada em pacientes com HPV+/p16+, intermediária em pacientes HPV-/p16+ e mais limitada em pacientes com as combinações de HPV-/p16- ou HPV+/p16-. Porém, novos ensaios são obrigatórios para investigar a sobrevida dos pacientes incluindo aqueles com HPV+/p16- e HPV-/p16+, visando a adaptação do regime terapêutico futuro de acordo com o estatus HPV/p16.

Desta forma, compreendendo os mecanismos de modificação do ciclo celular promovidos pelo HPV, tem sido proposto utilizar p16 como um indicador da participação viral na carcinogênese dos tumores de origem epitelial. No entanto, até o momento não há um consenso estabelecido para esta aplicação (Zaravinos, 2014).

2.1.4.2 Survivina

A survivina é um membro da família das proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) (Fukuda & Pelus 2006), descrita primeiramente por Ambrosini et al. (1997) em estudo de carcinomas e linfomas (Dubrez-Daloz et al., 2008). É uma proteína multifuncional que regula a divisão celular, inibe a apoptose, e aumenta a angiogênese (Duffy et al., 2007; Mita et al., 2008). Só se encontra primariamente expressa na fase fetal, mas não nos tecidos adultos,

encontrando-se sobre expressa num elevado leque de tumores. É responsável pelo aumento da resistência tumoral, por inativar a ação de agentes quimioterapêuticos e nomeadamente por interferir com moléculas envolvidas na apoptose (Fukuda & Pelus, 2006). A inibição da apoptose tem implicância direta na formação e evolução do câncer. Estando associada não somente a carcinogênese mas também na disseminação e promoção de resistência terapêutica (Hanahan & Weinberg, 2010).

Apresenta fundamental importância no aparato do fuso mitótico durante a citocinese e a separação cromossomal, atuando como reguladora positiva da fase G2/M. As células embrionárias deficientes de survivina, devido a defeitos na formação do fuso mitótico, possuem alteração no tamanho e morfologia do núcleo, além de multinucleação (Sommer et al., 2003). A expressão desregulada da survivina promove mudanças na ploidia e, por isso, uma superexpressão dessa proteína em tumores malignos pode favorecer a progressão aberrante de células mutadas (Invernizzi et al., 2006).

As células tumorais circulantes também expressam níveis elevados de survivina que, também podem ser responsável pela evasão imune de células tumorais. Embora o seu papel na divisão celular e apoptose tenha sido substancialmente investigados, ainda há escassez de dados sobre a contribuição da survivina para a evasão imune por células tumorais (Garg et al., 2012).

Em tumores malignos, o gene da survivina é reativo e a superexpressão da proteína pode ser evidenciada por hibridização *in situ*, reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa (RT-PCR), *western blotting* e imunohistoquímica. Vários estudos correlacionaram a expressão de survivina, nos tumores sólidos, com um curso clinicamente desfavorável da doença, resistência a fármacos, pior prognóstico, menor sobrevida do paciente (Church e Talbot, 2012) e aumento da taxa de recorrência da doença (Invernizzi et al., 2006; Nikitakis, et al., 2009).

Em 2003, Lo Muzio et al. descobriram que pacientes com baixa expressão de survivina em carcinomas epidermoides orais tinham significativamente melhores taxas de sobrevivência do que pacientes com expressões de survivina média e alta.

Dong et al. (2002) examinaram a expressão de survivina em 102 casos de carcinomas espinocelulares laríngeos por imunohistoquímica: 66% dos tumores foram positivos para survivina. A análise de *Kaplan Meier* mostrou que a expressão de survivina estava significativamente associada com menor sobrevida global e livre doença.

A survivina está envolvida na tumorigênese por meio de diversos mecanismos, incluindo a participação em uma variedade de vias, tal como a via de sinalização *p53*. Dado

que a superexpressão de survivina e a interrupção de *p53* tipo selvagem são comumente associadas à tumorigênese (Lai et al., 2014), existe uma alta possibilidade de que a survivina esteja funcionalmente ligada à *p53*. Uma variedade de estudos indicam que *p53* do tipo selvagem, mas não *p53* mutada, pode reprimir a expressão de survivina ao nível da transcrição (Hoffman et al., 2002) e que a perda de função da survivina parcialmente medeia a via apoptótica *p53*-dependente. Por outro lado, a survivina também pode regular a expressão de *p53*. A superexpressão da survivina em células de câncer de pulmão humano bloqueou a apoptose dependente de *p53* através de uma maneira dependente da dose (Mirza et al., 2002), sugerindo que a survivina regula (pelo menos em parte) a via apoptótica *p53*-dependente (Wang et al., 2004). Está bem estabelecido que as proteínas E6 do HPV de alto risco induzem a degradação de *p53* a que a expressão de *p53* resulta na regulação negativa da survivina. Uma relação direta entre a expressão de survivina e a presença de HPV em carcinomas de células epidermóides foi encontrada, o que sugere que a carcinogênese associada ao HPV pode ter um efeito na regulação dos níveis de expressão de survivina (Lo Muzio et al, 2004, 2005).

Giovanelli et al. (2002) determinaram a prevalência de HPV em 61% de 13 casos de carcinoma epidermoide e 27,1% das 59 lesões com potencial de transformação maligna. Baseados no trabalho de Lo Muzio et al. (2004) decidiram investigar a expressão da survivina associada à presença de HPV em casos de carcinomas epidermóides e lesões com potencial de transformação maligna, levantando a hipótese de uma possível modulação da apoptose e suas proteínas reguladoras no processo de carcinogênese oral, como já acontece com oncoproteínas virais E6, que necessitam de interação com produtos da *p53*. Foi avaliada a presença de HPV em 14 carcinomas epidermóides, 16 leucoplasias bucais e 20 amostras de mucosa normal. A expressão da survivina foi verificada em 4/7 casos (57,1%) HPV+ e 4/4 casos (100%) HPV- nos casos de carcinomas epidermóides; para os casos de leucoplasias 6/7 casos (85,7%) HPV+ e 5/9 casos (55,5%) HPV-.

Estudos sobre a relação entre a expressão de survivina e presença de HPV sugerem que o HPV pode ter um efeito direto ou indireto na regulação dos níveis de expressão de survivina. Carcinomas epidermóides orais HPV-, caracterizados por altos níveis de expressão de survivina, poderiam ter uma pior resposta clínica em comparação com carcinomas epidermóides orais HPV+ caracterizados por baixos níveis de expressão de survivina. Por outro lado, a expressão de survivina em carcinomas epidermóides orais HPV+ pode ser útil para a detecção de lesões com comportamento desfavorável, similar ao dos cânceres orais HPV-, que quase sempre têm uma expressão elevada de survivina. Lesões de carcinomas

epidermóides orais HPV+ com níveis mais elevados de expressão de survivina poderiam ter uma pior evolução clínica: a survivina consegue parar a apoptose e promover a transformação celular. Em estudos retrospectivos a expressão de survivina está correlacionada com a redução da sobrevida global em carcinomas epidermóides orais (Lo Muzio et al., 2005).

A expressão de survivina e p16, como marcador substituto para o estado de HPV, foi analisada por imunohistoquímica em um estudo realizado por Preuss et al. (2008) e mostrou que o acúmulo nuclear de survivina correlacionou-se com a carcinogênese independente do HPV e foi um preditor independente de baixa sobrevida em pacientes com carcinomas epidermóides orofaríngeos.

Alguns trabalhos mostram que a expressão da survivina é importante em neoplasias humanas como alvo terapêutico no tratamento do câncer e como fator prognóstico. Xia et al. (2002) demonstraram que a redução da expressão da survivina pode propiciar a morte celular por apoptose e a sensibilização de fármacos contra o tumor. A survivina é expressa, em concentrações baixas, em células normais de cordão umbilical e em células tronco de medula óssea, ambas CD34+. Entretanto, em blastos mielóides e em linfócitos de algumas desordens linfoproliferativas a expressão de níveis significantes dessa proteína pode ser observada. Isso sugere que a survivina tem papel importante no aumento da proliferação de células neoplásicas (Invernizzi et al., 2006).

Evidências múltiplas indicam que, nas linhagens celulares de CECP, a inibição da survivina aumenta significativamente a atividade antitumoral de várias terapias citotóxicas e outras terapias direcionadas (Marioni et al., 2010). A survivina é um alvo potencial atraente para as terapias contra o câncer, porque raramente é expresso em células normais, mas notavelmente desregulado em vários tipos de cânceres (Altieri, 2013). Sua expressão em neoplasias e desordens com potencial de transformação maligna pode estar relacionada à malignização e prognóstico desfavorável (Lo Muzio et al., 2001; Freier et al., 2007). A superexpressão de survivina em tecidos de CECP representa um fator importante que prediz prognóstico e resistência à quimioterapia e/ou radioterapia (Zhang et al., 2015).

2.1.4.3 PD-L1

Historicamente a atribuição do sistema imune em um ambiente tumoral originou-se pelo conceito de vigilância imunológica descoberto há anos, que evidencia a capacidade do sistema imune de prevenir a formação de tumores, eliminando as células potencialmente malignas (Burnet, 1970). Mas, ao mesmo tempo, o sistema imune seleciona ou promove

variantes do tumor com reduzida imunogenicidade (Zitvogel et al., 2006), fornecendo seu desenvolvimento através de um mecanismo conhecido como escape tumoral da detecção e eliminação pela resposta imune (Dunn et al., 2002; Schreiber, 2005).

Em resposta aos processos de carcinogênese, considerados como sinais de perigo, células residentes do sistema imune inato imediatamente alertam o restante do sistema imune pela ampla produção de citocinas (Visser & Coussens, 2005). Estas citocinas, produzidas durante a resposta imune aguda, promovem a diferenciação e ativação de células imaturas como os linfócitos T (Smyth, 2004), que se originam na medula óssea. São células da imunidade celular, portanto não produzem anticorpos, reconhecem antígenos de microrganismos ou células infectadas, destruindo-os através de receptores de antígenos em suas membranas com especificidade restrita. Esse reconhecimento antigênico aplica-se apenas a peptídeos ligados a proteínas do hospedeiro que são codificadas pelos genes do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e que se expressam nas superfícies de outras células (Abul et al., 2007; Janeway et al., 2008).

Os principais tipos de linfócitos T são os auxiliares (*T Helper* ou CD4), os citotóxicos (T citolíticos ou CD8) e os reguladores (*Treg*). Os linfócitos T auxiliares secretam citocinas (proteínas) que estimulam a proliferação e diferenciação de células T, células B, macrófagos e outros leucócitos. Já os linfócitos T citotóxicos destroem células com antígenos estranhos. Além disso, os linfócitos T reguladores são células T auxiliares diferenciadas que estão aumentadas no microambiente tumoral, inibindo a função dos linfócitos T CD4, T CD8, e células dendríticas, sendo responsáveis pela vigilância e tolerância imunológica, ou seja, pela inibição de respostas imunológicas a antígenos próprios (Abul et al., 2007; Janeway et al., 2008).

Os tumores desenvolveram diversos mecanismos de evasão do sistema imune e de imunossupressão, o que compromete a destruição eficaz ocasionada pelo sistema imune. A esse processo chama-se de resistência adaptativa dos tumores. Uma das vias mais importantes de resistência adaptativa recentemente descoberta trata-se da via do PD (Moreno & Ribas, 2015). Essa via é composta pelo PD-1 e pelos seus dois ligantes, PD-L1 e PD-L2 (Dolan & Gupta, 2014).

O PD -1, *programmed death 1*, é um receptor imune inibitório da família do CD28, expresso em diversas células imunes, tais como células B e T ativadas, monócitos, células NK e vários linfócitos tumor-infiltrativos (TILs) (Dolan & Gupta, 2014), mas particularmente em células citotóxicas. Ele interage com dois tipos de ligantes: o PD-L1 é expresso em células tumorais e outras células imunes, além de células endoteliais vasculares e células das ilhotas

pancreáticas; e o PD-L2, o qual é expresso primariamente em macrófagos e células dendríticas (Kim & Eder, 2014).

A interação PD-1/PD-L1 previne a estimulação excessiva da resposta imune e contribui para a manutenção da tolerância imune periférica a autoantígenos (Moreno & Ribas, 2015), através da anergia, inibição da proliferação e das funções ejetoras, induzindo à apoptose das células T previamente ativadas pela apresentação do antígeno (Zitvogel & Kroemer, 2012; Chen & Xue, 2015).

A especificidade das células T em relação aos seus alvos é mediada pela interação de receptores em sua superfície (TCR) com complexos MHC associados a peptídeos antigênicos presentes na superfície de células apresentadoras de antígeno (APC) ou células tumorais. Porém, a resposta ao sinal de apresentação dos antígenos é regulada por uma série de receptores co-regulatórios (co-receptores) expressos na célula T que reconhecem ligantes adicionais presentes na superfície das APC ou células tumorais (Peggs et al., 2008). Estes co-receptores podem tanto induzir cascatas de sinalização intracelulares positivas (estimulatórias) quanto negativas (inibitórias), assim modulando a atividade da célula T relacionada à proliferação, secreção de citocinas e lise celular. Estas moléculas do sistema imune, que podem tanto estimular quanto inibir sinais, são conhecidas por “*checkpoints* imunológicos”. As células tumorais interagem com os *checkpoints* para sobreviverem a destruição pelo sistema imunológico. Muitas células do câncer expõem a proteína ligante PD-L1 que, ao se fixar ao receptor PD-1 no linfócito, inibem o sistema imunológico. Desta forma, as células do câncer escapam do controle e continuam sua migração e multiplicação, favorecendo o crescimento e disseminação do tumor (Blank & Mackensen, 2007).

A expressão de PD-L1 por diversos tumores decorre de mecanismo intrínseco, através do processo oncogênico ou da indução direta pela célula T ativada ou pela liberação de citocinas (IFN-gama) pela célula T ativada (Moreno & Ribas, 2015). Os antígenos tumorais são apresentados por células tumorais, células do estroma tumoral, e células infiltrativas hematopoiéticas, tais como células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (essas células também podem induzir a expressão de PD-L1 na superfície de células tumorais adjacentes). Após a ativação em órgãos linfoides, células T efetoras tumor específicas se infiltram no sítio tumoral e se tornam TILs (*tumor-infiltrating lymphocytes*). Através do reconhecimento específico via receptor de célula T, as TILs liberam IFN-gama, o qual pode induzir a expressão de PDL1 na superfície das células tumorais adjacentes (Chen & Xue, 2015; Moreno & Ribas, 2015).

Apesar de a liberação de IFN γ ser o mecanismo principal de resistência adaptativa, o PD-L1 pode ser expresso pelas células tumorais por vias de sinalização oncogênicas constitutivas (Chen & Xue, 2015; Pardoll, 2012). Isso é evidenciado por uma fração pequena de cânceres humanos, os quais não possuem TILs no foco do tumor, mas mesmo assim, expressam altos níveis de PD-L1 (Chen & Xue, 2015).

O PD-L1 é expresso em diversos tumores, dentre os quais se destacam os de cabeça e pescoço, ovário, pulmão, estômago, colon, pâncreas, rim, mamas, cérvix, melanoma, glioblastoma, mieloma múltiplo, linfoma e leucemias (Ji, et al., 2015).

Estudos iniciais, relatados por muitos grupos, mostraram que PD-L1 é frequentemente expresso em células de cânceres humano e se correlacionam significativamente com o mau prognóstico em vários tipos de tumores (Boland et al., 2013). Sua expressão elevada pode ser um importante facilitador para o crescimento tumoral e metástase (Pardoll, 2012; Torre et al., 2015).

O CECP é considerado uma das neoplasias mais imunossupressoras (Chen et al., 1999; Bose et al., 2006; Bose et al., 2008). Vários estudos analisaram a expressão de PD-L1 em CECP, contudo, as características clinicopatológicas associadas à expressão de PD-L1 permanecem largamente desconhecidas (Lyford-Pike et al., 2013; Badoual et al., 2013).

Ukpo et al. (2013) relataram que PD-L1 foi expressa em 84 de 181 pacientes (46%) com câncer orofaríngeo e não foi observada associação entre a expressão de PD-L1 em relação ao sexo, história de tabagismo, estágio ou outros parâmetros clínicos. Entretanto, houve associação entre expressão de PD-L1 e metástase à distância (Cho et al., 2011; Ukpo, Thorstad & Lewis, 2013). Outros estudos em câncer nasofaríngeo relataram resultados conflitantes. Um estudo relatou associação da expressão de PD-L1 com TNM, enquanto o outro não mostrou correlação com nenhum dos parâmetros clínico-patológicos examinados (Zhang et al., 2008; Hsu et al., 2010).

Em um estudo recente, os tumores iniciais PD-L1 positivos mostraram uma diminuição significativa na expressão de PD-L1 na progressão da doença, enquanto tumores iniciais PD-L1 negativos mostraram um aumento significativo na expressão de PD-L1 na progressão da doença, independentemente dos regimes quimioterápicos (Kakavand et al., 2015). Alguns estudos sugerem que os tumores induzidos pela presença de HPV usam as vias PD-1/PD-L1 como um mecanismo adaptativo contra a imunidade antitumoral (Mirghani et al., 2015b).

Existe a hipótese que os cânceres orofaríngeos associados ao HPV expressam PD-L1 como um modo de evasão imunológica e os tumores que expressam PD-L1 apresentaram

maior probabilidade de serem HPV positivos, apontando assim para o papel potencial desta via como terapêutica no CECP associado ao HPV (Ukpo et al., 2013). No entanto, o estudo realizado por Kim et al. (2016) mostrou que PD-L1 foi altamente expressa em carcinoma epidermoide de orofaringe, mas não houve correlação entre expressão de PD-L1 e estado de HPV.

A evasão imune através do eixo PD1/PDL1 é relevante para ambas as etiologias, viral (HPV) e não viral (*p53*) do CECP (Feldman et al., 2014). No entanto, não está claro se a via PD-1: PD-L1 desempenha um papel maior no CECP HPV+ em comparação com o CECP HPV- (Kreimer et al., 2005).

As células tumorais de CECP são conhecidas por exibirem altos níveis de expressão de PD-L1. Estudos pré-clínicos indicam que o bloqueio da interação PD-1 e PD-L1 aumenta a ativação das células T e inibe o crescimento tumoral (Iwai et al., 2002; Strome et al., 2003).

A relevância do *checkpoint* imunológico PD-1: PD-L1, na imunidade contra o câncer, é destacado por vários relatórios, demonstrando que o bloqueio de PD-1 ou PD-L1 por anticorpos monoclonais específicos pode inverter o estado anérgico de células T específicas de tumores e, conseqüentemente, aumentar as respostas imunitárias antitumorais (Hirano et al., 2005; Porichis et al., 2011).

Clinicamente, PD-L1 é expresso em vários tipos de tumores e está associado a um prognóstico ruim em muitos cânceres, incluindo adenocarcinoma pulmonar e carcinoma de células renais (Kim & Eder, 2014). Pacientes com carcinoma de células renais, os quais expressam PD-L1 associado a TILs ou não, apresentam risco aumentado 4,5 de toxicidade e morte (Pardoll, 2012; Dolan & Gupta, 2014), enquanto a expressão de PD-L1 em melanoma parece estar associada a melhores prognósticos (Kim & Eder, 2014). Ainda sobre o melanoma, outro estudo mostrou que a expressão de PD-L1 está associada ao aumento de crescimento do tumor (Pardoll, 2012).

A expressão de PD-L1 no tumor mostrou correlação com resultados favoráveis e desfavoráveis em várias malignidades. A utilização de PD-L1 como marcador prognóstico e de resposta ao tratamento com imunoterapia é controverso (Kim & Eder, 2014). Os dados iniciais disponíveis referem-se à expressão de PD-L1 em tumores como um possível biomarcador preditivo de resposta a fármacos anti-PD-1 PD-L1. Contudo, estes dados devem ser confirmados e o papel da expressão tumoral de PD-L1 tem de ser mais elucidado (Dolan & Gupta, 2014). Estes resultados contraditórios em vários tumores podem ser atribuídos, em parte, à falta de uniformidade nos ensaios, incluindo a variabilidade intra ou interobservador de IMQ, a falta de anticorpos padronizados para determinar a expressão de PD-L1 e vários

valores de corte para definir expressão positiva. Outra possível explicação é que a sinalização PD-L1 não apenas regula a imunidade das células T efetoras antitumorais mas também interage com a resposta imune inata e adaptativa (Dong et al., 2002)

O estudo realizado por Kim et al. (2016) sugere a possibilidade de mudanças dinâmicas na expressão de PD-L1. Além disso, diferenças na expressão de PD-L1 entre células tumorais e células inflamatórias infiltrantes de tumores podem ser uma possível causa de resultados conflitantes.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Identificar os níveis expressivos de p16, survivina e PD-L1 em amostras de lesões malignas de cabeça e pescoço na presença e na ausência de infecção viral por HPV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença de infecção viral por HPV nos carcinomas de cabeça e pescoço da região, oriundos do Serviço de Oncologia do Hospital Geral de Caxias do Sul e do Laboratório Diagnóstico.
- Associar a expressão dos biomarcadores com os achados clínicos dos pacientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para o estudo foram utilizadas 33 amostras teciduais, obtidas por biopsia de lesões de cabeça e pescoço, com finalidade diagnóstica, armazenadas em blocos de parafina, oriundas do Serviço de Oncologia do Hospital Geral de Caxias do Sul e do Laboratório Diagnóstico. As amostras mantidas em um banco de dados foram selecionadas retrospectivamente para o estudo, sendo utilizado como critério de seleção das mesmas a presença carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. O prontuário dos pacientes foi utilizado para a caracterização das amostras quanto à idade, gênero, tabagismo, etilismo e estadiamento.

No presente estudo o “n” amostral foi definido com base no número de casos disponíveis no Serviço de Oncologia do Hospital Geral de Caxias Do Sul e no Laboratório Diagnóstico e em estudos da literatura. Feldman et al. (2014) investigaram a expressão de PD1 e PDL1 em 34 casos de CECP, Negi et al. (2015) avaliaram a expressão de survivina em 45 amostras, sendo 15 de mucosa oral normal, 15 de leucoplasias e 15 de carcinomas epidermóides oral. Zatonski et al. (2016) estudaram a expressão de proteínas em 56 casos de papilomas da faringe e laringe; Yanget al. (2016), avaliaram a expressão de p16 em 46 casos de carcinomas de hipofaringe. Sendo assim, a escolha do “n” amostral demonstrou-se adequada e representativa conforme dados previamente publicados.

4.2 BIOLOGIA MOLECULAR

O material proveniente de blocos de parafina foi submetido a 2 cortes de 10 µm, para cada amostra. Para a remoção da parafina, foram realizadas 2 lavagens com xilol e etanol absoluto. Após a lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o “*pellet*” seco em temperatura ambiente. Posteriormente a esta etapa, procedeu-se a extração de DNA das amostras, utilizando-se o kit *Wizard® Genomic, DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA)*, conforme instruções do fabricante.

Após a extração, o DNA foi quantificado utilizando o *Qubit* e as amostras foram submetidas à PCR, utilizando-se o conjunto de iniciadores genéricos para HPV, PGMY 09/11 (Gravitt et al., 2000), que amplificam aproximadamente 450 pares de bases (pb) do gene L1 de diversos tipos do HPV. Foram adicionados os iniciadores GH20 e PCO4 (Saiki et al.,

1988) que amplificam 268 pb do gene da β -globina humana, servindo como controle interno para avaliação da integridade e suficiência de DNA de cada amostra.

A reação em cadeia da polimerase foi realizada em um volume de reação de 13 μ L, formada por uma solução equimolar de cada um dos iniciadores genéricos PGMY 09/11 na concentração de 25 μ M de cada oligonucleotídeo, iniciadores GH20 e PCO4 (20 mM de cada iniciador), 15 mM de 10x PCR Buffer, 4 mM de $MgCl_2$, 100 μ M de dCTP, 100 μ M de dGTP, 100 μ M de dATP, 100 μ M de dTTP e 0,2 μ L de *Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen)*. A amplificação foi realizada em um tubo único, através da utilização de 40 ciclos em termociclador (*2720 Thermal Cycler*). Cada ciclo incluiu 1 minuto de desnaturação a 95°C, 1 minuto de anelamento a 53°C e 1 minuto de alongamento da cadeia a 72°C. O primeiro ciclo foi estendido por 13 minutos de desnaturação a 95°C. O último passo de alongamento da cadeia a 72°C foi procedido por 5 minutos, modificado de Gravitt et al. (2000). Foram incluídos controles positivos e negativos na reação. Os controles positivos foram compostos por amostras do Laboratório Diagnose de Caxias do Sul, positivas para HPV. O controle negativo utilizado compreendeu uma mistura da reação, porém sem DNA.

Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 4,6%, utilizando-se tampão TBE 1X e posterior coloração com nitrato de prata. Como marcador de peso molecular foi utilizado o 50 pb (*Invitrogen*).

Posteriormente, foi realizado o NESTED-PCR, onde as amostras foram amplificadas na primeira reação de PCR usando os *primers* degenerados GP-E6-3F (GGG WGK KAC TGA AAT CGG T), GP-E6-5B (CTG AGC TGT CAR NTA ATT GCT CA) e GP-E6-6B (TCC TCT GAG TYG YCT AAT TGC TC), sendo W, A/T; K, G/T; R, A/G; Y, C/T e N, A/C/G/T. Estes *primers* amplificam uma região de 630 pb da região E6/E7 dos 38 tipos do HPV mais comuns. A reação de NESTED-PCR foi específica e foi realizada para os tipos virais 16, 18, 31, 59, 45, 33, 6/11, 58, 52, 56, 35, 42, 43, 44, 68, 39, 51 e 66. Os primers usados e os tamanhos dos produtos amplificados estão discriminados na Tabela 1. Todo procedimento, tanto na primeira reação (PCR) quanto na segunda reação (NESTED-PCR), ocorreu segundo Sotlar et al. (2004). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 4,6%, utilizando-se tampão TBE 1X e posterior coloração com nitrato de prata. Como marcador de peso molecular foi utilizado o *pGEM (Promega)*.

Tabela1: *Primers* utilizados na PCR “nested”

Tipo do HPV	<i>Primer</i>	Tamanho do fragmento
Alto risco oncogênico		
16	CACAGTTATGCACAGAGCTGC CATATATTCATGCAATGTAGGTGTA	457 pb
18	CACTTCACTGCAAGACATAGA GTTGTGAAATCGTCGTTTTTCA	322 pb
31	GAAATTGCATGAACTAAGCTCG CACATATACTTTGTTTGTCAA	263 pb
59	CAAAGGGGAACTGCAAGAAAG TATAACAGCGTATCAGCAGC	215 pb
45	GTGGAAAAGTGCATTACAGG ACCTCTGTGCGTTCCAATGT	151 pb
33	ACTATACACAACATTGAACTA GTTTTTACACGTCACAGTGCA	398 pb
68	GCAGAAGGCAACTACAACGG GTTTACTGGTCCAGCAGTGG	333 pb
58	GTAAAGTGTGCTTACGATTGC GTTGTTACAGGTTACACTTGT	274 pb
52	TAAGGCTGCAGTGTGTGCAG CTAATAGTTATTTCACTTAATGGT	229 pb
56	GTGTGCAGAGTATGTTTATTG TTTCTGTCACAATGCAATTGC	181 pb
35	CAACGAGGTAGAAGAAAGCATC CCGACCTGTCCACCGTCCACCG	358 pb
39	GACGACCACTACAGCAAACC TTATGAAATCTTCGTTTGCT	280 pb
51	GAGTATAGACGTTATAGCAGG TTTCGTTACGTTGTGCGTGTACG	223 pb
66	TTCAGTGTATGGGGCAACAT AAACATGACCCGGTCCATGC	172 pb
Baixo risco oncogênico		
6/11	TGCAAGAATGCACTGACCAC TGCATGTTGTCCAGCAGTGT	334 pb
42	CCCAAAGTAGTGGTCCCAGTTA GATCTTTCGTAGTGTGCGCAGTG	277 pb
43	GCATAATGTCTGCACGTAGCTG CATGAAACTGTAGACAGGCCAAG	219 pb
44	TAAACAGTTATATGTAGTGTACCG TATCAGCACGTCCAGAATTGAC	163 pb

4.3 IMUNOHISTOQUÍMICA

Foi realizada a metodologia para imunohistoquímica previamente padronizada pelo laboratório Diagnóstico de Caxias do Sul.

No material histopatológico (blocos de parafina com amostras teciduais de lesões de cabeça e pescoço) foi processado o método de imunohistoquímica para survivina, p16 e PD-L1. Cortes teciduais com espessura de 5 µm foram montados sobre lâminas preparadas com solução de APTS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich) a 5 %, em acetona PA, sendo mantidas em estufa (50 °C) durante 1 h, para fixação dos cortes. Após fixação, os cortes foram desparafinizados em xilol e re-hidratados por passagens sucessivas em etanol, em concentrações decrescentes (etanol absoluto, etanol 90 %, 80 % e 70 %). Com o objetivo de eliminar reações inespecíficas falso-positivas, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena. Para tanto, as lâminas foram imersas em solução de peróxido de hidrogênio 1,5 % e metanol absoluto (v/v), por 20 minutos, com posterior lavagem com água destilada. Previamente a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram submetidas ao tratamento para reativação antigênica, com a finalidade de recuperar os sítios antigênicos mascarados pela fixação e inclusão do tecido em formol e parafina. Para este fim, foi utilizada uma solução composta por 180 ml de ácido cítrico 0,1 M e 820 ml de citrato de sódio 0,1 M (pH 6,0). As lâminas foram imersas nesta solução de reativação antigênica diluída 1:10 em água destilada e mantidas em banho-maria ajustado para 95 – 98 °C, durante 45 min. Logo após, ainda como parte do processo térmico de reativação antigênica, as lâminas foram retiradas do banho-maria, mantidas durante 20 minutos em temperatura ambiente e lavadas em água destilada. Após a lavagem das lâminas, as mesmas serão submersas em PBS.

A imunodeteção foi realizada utilizando anticorpos monoclonais de rato (Dako, Diluição 1:100) para a survivina, utilizando-se testículo como controle positivo. Para p16 utilizou-se o anticorpo monoclonal de rato (Zeta, Diluição 1:100), utilizando-se colo do útero como controle positivo. E para PD-L1 utilizou-se o anticorpo monoclonal de coelho (Bio SB, Diluição 1:100), utilizando-se placenta como controle positivo. A solução contendo os anticorpos foi adicionada sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida (2 – 8 °C), durante 12 – 16 horas. A seguir, as lâminas foram lavadas com tampão PBS em temperatura ambiente. Após lavagem, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário anti-IgG/IgM conjugado com um polímero de peroxidase (En Vision Plus; Dako Cytomation) em câmara úmida, durante 1 h, em temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas duas lavagens com PBS por 5 minutos, em temperatura ambiente. As amostras

foram submetidas a uma revelação colorimétrica com kit comercial (Dako Cytomation), através de uma solução cromógena contendo 0,03 % de 3,3'-diaminobenzidina (3,3,4,4'-tetraaminobiphenyltetrahydrochloride), previamente diluída em tampão imidazol (pH 7,2) e peróxido de hidrogênio a 0,3 %. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com solução de hematoxilina de Harris, desidratação através de passagem das lâminas em concentrações crescentes de etanol (etanol 70 %, 80 %, 90 % e etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Entellan (Merck, SP, Brasil).

4.3.1 Quantificação da Imunohistoquímica

Os resultados foram obtidos através da análise das lâminas, por dois médicos patologistas treinados, em separado, com a utilização de microscópio óptico (Nikon Eclipse E200) e câmera digital (DS-5M-L1; Nikon, NY, USA) acoplados. As imagens digitalizadas foram transferidas para um computador.

Os resultados da IMQ foram avaliados considerando a proporção de células positivas comparadas ao número total de células no campo. Células com imunomarcção citoplasmática e nuclear foram consideradas positivas. Foram obtidas 4 fotografias dos melhores campos de observação das lâminas no aumento de 400x. Cada fotografia foi dividida em 4 quadrantes e uma contagem manual foi realizada para se obter uma porcentagem de positividade (Godoy et al., 2008).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada empregando-se o pacote estatístico *SPSS – Statistical Package for Social Science* (versão 20.0). Os dados foram descritos em relação à frequência, utilizando-se estatística descritiva.

4.5 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da UCS através do CAAE: 47152015.5.0000.5341, conforme Anexo1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para decidir quais biomarcadores seriam utilizados neste trabalho, foi realizado um estudo piloto, baseado em outros trabalhos conduzidos na literatura, com o objetivo de identificar, por imunohistoquímica, os níveis expressionais dos biomarcadores p53, tubulina, EGFR, p63 e p16 em amostras de lesões malignas de cabeça e pescoço. Para o estudo foram utilizadas 7 amostras teciduais, obtidas por biópsia de lesões de cabeça e pescoço, com finalidade diagnóstica, armazenadas em blocos de parafina, oriundas do Serviço de Oncologia do Hospital Geral de Caxias do Sul. As amostras mantidas em um banco de dados foram selecionadas retrospectivamente para o estudo, sendo utilizado como critério de seleção das mesmas a presença de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço. Os resultados foram publicados (Anexos 2 e 3). A partir deste estudo foram selecionados os biomarcadores p16, survivina e PD-L1 para a realização deste trabalho.

5.1 DADOS CLÍNICOS

De acordo com a tabela 2, a amostra total compreendeu 33 casos de CECP, sendo 17 casos (52%) de cavidade oral e 16 casos (48%) de faringe e laringe. Os resultados encontrados mostram uma média de idade para o diagnóstico do CECP de 61,5 anos. A idade variou entre 39 e 77 anos, sendo que a maior parte dos casos ficou entre 50 e 69 anos. Os 33 casos (100%) de CECP avaliados eram do sexo masculino. As informações quanto ao consumo de álcool, hábito de fumar e estadiamento não foram obtidas em 13 casos (39%), sendo que dos 20 casos (61%) em que as informações foram obtidas, o consumo de álcool foi relatado por 19 pacientes (95%) e o hábito de fumar por 20 (100%). O estadiamento mostrou que os carcinomas se apresentavam em um nível mais evoluído da doença, sendo 20% estágio III, 80% estágio IVA e IVB.

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, mostrando que o tipo mais comum de CECP é o carcinoma epidermoide (Karia et al., 2013). No Brasil, as localizações mais frequentes são a cavidade oral e laringe (Brasil, 2014), sendo que estudos recentes mostram uma diminuição da incidência de câncer de cavidade oral, especialmente em países desenvolvidos, e assinalam aumento da incidência de câncer de orofaringe notadamente relacionado à infecção por HPV (Chi et al., 2015). Do total de casos, 95% afetam indivíduos do sexo masculino acima dos 45 anos e, de acordo com a idade, a incidência deste tipo de câncer aumenta, sendo que a maioria dos pacientes se encontra acima dos 50 anos de idade

(Bast et al., 2000). Os principais fatores de risco para os CECPs são o tabagismo e o etilismo, juntos esses fatores têm um efeito mutagênico sinérgico e aumentam consideravelmente a chance de desenvolvimento do câncer (Thavaraj et al., 2011). A maioria dos casos de CECP é diagnosticada em estágio clínico avançado da doença (Herchenhorn, 2004; Leitzmann et al., 2008).

Tabela 2: Dados clínicos dos CECP estudados

Características	n	%
CASOS	33	100%
SEXO		
Masculino	33	100%
LOCALIZAÇÃO		
Cavidade oral	17	52%
Faringe e Laringe	16	48%
IDADE		
30-39 anos	1	3%
40-49 anos	2	6%
50-59 anos	14	43%
60-69 anos	10	30%
70-79 anos	6	18%
ETILISMO		
Não informado	13	39%
Informado	20	61%
Etilistas	19	95%
TABAGISMO		
Não informado	13	39%
Informado	20	61%
Tabagistas	20	100%
ESTADIAMENTO		
Não informado	13	39%
Informado	20	61%
Estadio III	4	20%
Estadio IVA e IVB	16	80%

5.2 AVALIAÇÃO DO HPV

Conforme a tabela 3, dos 33 casos avaliados, 8 (24%) foram positivos para HPV e 25 (76%) foram negativos. Todos os sítios anatômicos apresentaram casos positivos para HPV, sendo que dos 17 casos de cavidade oral, 3 (18%) eram HPV+ e dos 16 casos de faringe e laringe, 5 (31%) eram HPV+. De acordo com a literatura, nos últimos anos, a participação do HPV na patogênese dos tumores de cabeça e pescoço tem sido sugerida em vários estudos, sobretudo relacionada ao carcinoma de células escamosas de orofaringe (Combes &

Franceschi, 2014; Zaravinos, 2014). Embora os tumores HPV+ sejam mais comumente encontrados dentro da orofaringe, eles também foram encontrados ao longo de cada local do trato aerodigestivo superior (Gillison et al., 2000).

Foram detectados os tipos de alto risco 51, 58, 66 e os tipos de baixo risco 42, 43, podendo ter infecções por um único tipo de HPV ou por múltiplos tipos, não tendo preferência por sítio anatômico. Dayyani et al. publicaram uma metanálise no ano de 2010 que analisou 34 estudos e encontrou uma prevalência de 21,95% do HPV em CECp. Representando 86,69% de todos os casos HPV+, o tipo viral mais encontrado foi o HPV-16. Apesar da predominância do HPV-16 nos CECps, uma análise de amostras de raspado oral revelou a presença de um amplo espectro de tipos de HPV (Bottalico et al., 2011). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 685 mil pessoas, entre a população sexualmente ativa, são infectadas pelo HPV a cada ano (Okada, 2000). As infecções pelo vírus ocorrem em todo o mundo, sendo relativamente comuns, acometendo ambos os sexos (Hubbard, 2003). A prevalência da infecção e a distribuição dos tipos variam em diferentes países e, dentro do mesmo país, nas diferentes regiões. Desse modo, a epidemiologia da infecção necessita ser avaliada em cada região (Castellsaqué et al., 2001).

Tabela 3: Detecção e tipagem do HPV

Avaliação do HPV	n	%
Geral		
HPV-	25	76%
HPV+	8	24%
Tipo 43	2	25%
Tipo 51	2	25%
Tipo 66	2	25%
Tipo 42 e 43	1	12,5%
Tipo 43, 51 e 58	1	12,5%
Cavidade oral		
HPV-	14	82%
HPV+	3	18%
Tipo 43	1	33,5%
Tipo 66	1	33,5%
Tipo 43, 51, 58	1	33%
Faringe e laringe		
HPV-	11	69%
HPV+	5	31%
Tipo 43	1	20%
Tipo 51	2	40%
Tipo 66	1	20%
Tipo 42 e 43	1	20%

A idade da maior parte dos casos HPV+ e HPV- ficou entre 50 e 59 anos. Segundo a literatura, um paciente com carcinoma HPV+ apresenta uma série de características individuais, entre elas, ter idade entre 40 e 59 anos (Pytynia et al., 2014; Dahlstrom et al., 2015;). Nossos resultados mostram casos de CECP com idade superior a 59 anos, o que pode ser explicado de acordo com a literatura, que mostra que a infecção por HPV pode não estar sempre envolvida nos CECPs, (Psyrris & Di Maio, 2008) pelo fato de que a transformação tumorigênica de células epiteliais pode ser induzida por HPV de alto risco apenas quando o DNA viral está integrado no genoma da célula hospedeira (Ling et al., 2009; Ciesielska et al., 2012). Em relação aos sítios anatômicos, na cavidade oral, nos casos HPV+, a idade prevalente foi 50 a 59 anos e nos casos HPV- foi 50 a 79 anos. Na faringe e laringe, nos casos HPV+, a idade prevalente foi 50 a 69 anos e, com HPV-, a idade prevalente foi 50 a 59 anos (tabela 4).

Tabela 4: Idade dos pacientes diagnosticados com CECP

Idade	n	%
Geral		
HPV-		
30-39 anos	1	4%
40-49 anos	2	8%
50-59 anos	10	40%
60-69 anos	7	28%
70-79 anos	5	20%
HPV+		
50-59 anos	4	50%
60-69 anos	3	37,5%
70-79 anos	1	12,5%
Cavidade oral		
HPV-		
30-39 anos	1	7%
40-49 anos	1	7%
50-59 anos	4	29%
60-69 anos	4	28,5%
70-79 anos	4	28,5%
HPV+		
50-59 anos	2	67%
60-69 anos	1	33%
Faringe e laringe		
HPV-		
40-49 anos	1	9%
50-59 anos	6	55%
60-69 anos	3	27%
70-79 anos	1	9%
HPV+		
50-59 anos	2	40%
60-69 anos	2	40%
70-79 anos	1	20%

As informações quanto ao consumo de álcool, hábito de fumar e estadiamento foram obtida em 5 casos (63%) HPV+ e 15 (60%) HPV-. Dos casos HPV+, 80% eram etilistas; e dos casos HPV- 100%. Tanto os casos HPV+ como HPV-, 100% apresentaram o hábito de fumar. De acordo com a literatura, os CECPs podem ser divididos em HPV- (via carcinogênica tabagismo/etilismo) e HPV+, uma vez que apresentam fatores de risco, oncogênese e prognósticos distintos (Syrjanen, 2010; Mirghani et al., 2015a). A hipótese de sinergismo entre as vias carcinogênicas HPV+ e HPV- (tabagismo/etilismo) no câncer da cavidade oral ou de orofaringe, apesar de proposta por alguns autores, não foi confirmada por um estudo realizado nos Estados Unidos (D'Souza et al., 2007). Apesar de já serem compreendidos os mecanismos de imortalização de células epiteliais normais por parte das

oncoproteínas do HPV, ainda desconhece-se o seu possível efeito na promoção de virulência em células já alteradas, ou seja, em carcinomas epidermóides HPV- (Lee et al., 2015). Apesar de proposta por alguns autores e não confirmada, nossos resultados mostram a hipótese de sinergismo entre os principais fatores envolvidos no desenvolvimento do CECP (tabela 5).

Tabela 5: Informações quanto ao etilismo e tabagismo dos pacientes diagnosticados com CECP

Avaliação dos CECP	n	%
ETILISMO		
HPV-		
Não informado	10	40%
Informado	15	60%
Etilistas	15	100%
HPV+		
Não informado	3	37%
Informado	5	63%
Etilistas	4	80%
TABAGISMO		
HPV-		
Não informado	10	40%
Informado	15	60%
Tabagistas	15	100%
HPV+		
Não informado	3	37%
Informado	5	63%
Tabagistas	5	100%

Quanto ao estadiamento (tabela 6), nos casos HPV+, 40% apresentavam estágio III e 60% estágio IVA e IVB. Nos casos HPV-, 13% apresentavam estágio III e 87% estágio IVA e IVB. Quando agrupamos os casos HPV+ e/ou p16+, observamos que apenas os tumores HPV+ apresentaram estágio III, indicando que estes tumores apresentam estádios menores comparados aos tumores HPV-. Nossos resultados estão de acordo com a literatura, mostrando que, clinicamente, os CECP HPV+ são tipicamente associados com estágio geral avançado do tumor, o que se deve principalmente ao aumento do envolvimento ganglionar. Surpreendentemente, estes tumores demonstraram, de forma consistente, um prognóstico melhorado em relação ao HPV-. A disparidade entre os efeitos celulares do HPV e os resultados clínicos ainda não é clara (Li et al., 1994).

Tabela 6: Informações quanto ao estadiamento dos CECP

Avaliação do CECP	n	%
ESTADIAMENTO		
HPV-		
Não informado	10	40%
Informado	15	60%
Estádio III	2	13%
Estádio IVA e IVB	13	87%
HPV+		
Não informado	3	37%
Informado	5	63%
Estádio III	2	40%
Estádio IVA e IVB	3	60%
ESTADIAMENTO HPV + e/ou p16+		
HPV-		
Não informado	7	47%
Informado	8	53%
Estádio IVA e IVB	8	100%
HPV+ e/ou p16+		
Não informado	6	33%
Informado	12	67%
Estádio III	4	33%
Estádio IVA e IVB	8	67%

5.3 EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE p16

Nos casos de carcinoma de cabeça e pescoço estudados, de acordo com a literatura (Ciesielska et al., 2017), p16 foi considerado superexpresso quando sua expressão, nuclear e/ou citoplasmática, foi $> 50\%$ (figura 1).

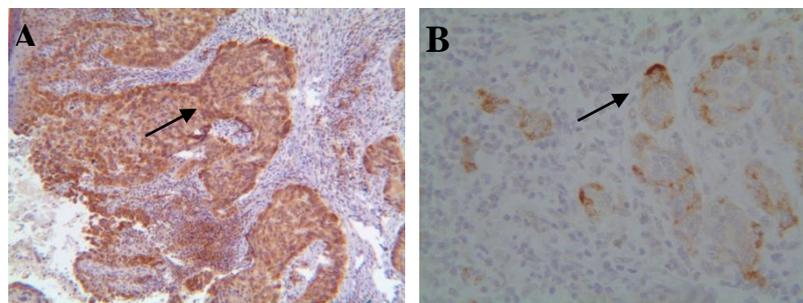


Figura 1: Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica, expressão, nuclear e/ou citoplasmática, de p16 $> 50\%$ (A) e $\leq 50\%$ (B). Células com marcação (setas). Escala: 20 μ m.

Vários estudos mostram que p16 pode fornecer evidências do potencial maligno de uma lesão e sua superexpressão pode ser considerada um marcador de prognóstico favorável (Yuen et al., 2002; Liang et al., 2012; Lewis, 2012).

A avaliação imunohistoquímica (tabela 7) mostrou a superexpressão de p16 em 34% dos casos. Dos casos HPV+, 12,5% apresentaram superexpressão de p16 e dos casos HPV- 40%.

Quanto à localização anatômica cavidade oral, 41% dos casos apresentaram superexpressão de p16. Dos casos HPV+ 33% e HPV- 43% apresentaram superexpressão de p16.

Quanto à localização anatômica faringe e laringe, 25% dos casos apresentaram superexpressão de p16. Nenhum dos casos HPV+ e 37% dos casos HPV- apresentaram superexpressão de p16.

Tabela 7: Expressão imunohistoquímica de p16

Localização	Grupo	n	>50%	≤50%	0%
Geral	GERAL	33	34%	42%	24%
	HPV+	8	12,5%	62,5%	25%
	HPV-	25	40%	36%	24%
Cavidade oral	GERAL	17	41%	35%	24%
	HPV+	3	33%	67%	-
	HPV-	14	43%	28,5%	28,5%
Faringe e laringe	GERAL	16	25%	50%	25%
	HPV+	5	-	60%	40%
	HPV-	11	37%	45%	18%

5.4 EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE SURVIVINA

Os casos de carcinoma de cabeça e pescoço estudados, de acordo com a literatura (Liu et al., 2017), foram considerados positivos para expressão de survivina, quando a expressão, nuclear e/ou citoplasmática, foi $\geq 5\%$ (figura 2), pelo fato de que o número de casos apresentado no nosso trabalho não permite identificar se os casos que apresentam expressão $< 5\%$, entram no grupo dos negativos ou representariam outro grupo.

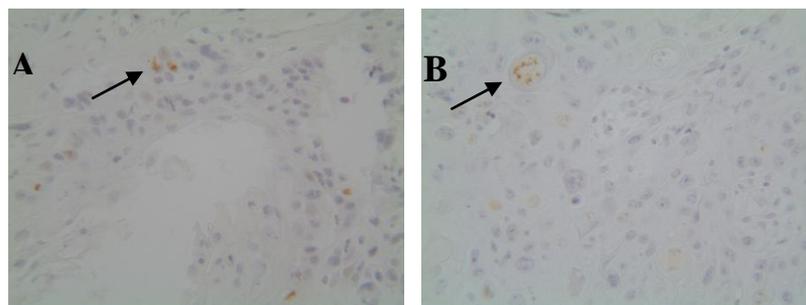


Figura 2: Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica, expressão, nuclear e/ou citoplasmática, de survivina $\geq 5\%$ (A) e $< 5\%$ (B). Células com marcação (setas). Escala : 20 μ m.

Vários estudos correlacionaram a expressão de survivina nos tumores sólidos, com um curso clinicamente desfavorável da doença, resistência a fármacos, pior prognóstico e menor sobrevida do paciente (Church & Talbot, 2012).

A avaliação imunohistoquímica (tabela 8) mostrou expressão de survivina em 15% dos casos. Dos casos HPV positivos 12,5% e dos casos HPV- 16% foram positivos para a expressão de survivina.

Quando agrupamos os casos HPV+ e/ou p16+ observamos que a expressão de survivina ocorre preferencialmente nos casos HPV+.

Quanto à localização anatômica cavidade oral, 6% dos casos foram positivos para expressão de survivina. Nenhum caso HPV+ foi positivo para a expressão de survivina e 7% dos casos HPV- foram positivos para expressão de survivina.

Quanto à localização anatômica faringe e laringe, 25% dos casos foram positivos para a expressão de survivina. Dos casos HPV+ 20% e dos HPV- 27% foram positivos para a expressão de survivina.

Tabela 8: Expressão imunohistoquímica de survivina na faringe e laringe

Localização	Grupo	n	≥5%	<5%	0%
Geral	GERAL	33	15%	24%	61%
	HPV+	8	12,5%	37,5%	50%
	HPV-	25	16%	20%	64%
Geral	HPV+ e/ou p16+	18	22%	28%	50%
	HPV-	15	7%	20%	73%
Cavidade oral	GERAL	17	6%	12%	82%
	HPV+	3	-	-	100%
	HPV-	14	7%	14%	79%
Faringe e laringe	GERAL	16	25%	37,5%	37,5%
	HPV+	5	20%	60%	20%
	HPV-	11	27%	27%	46%

5.5 EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE PD-L1

Os casos de carcinoma de cabeça e pescoço estudados, de acordo com a literatura (Ock et al., 2017), foram considerados positivos para expressão de PD-L1 quando a expressão, membranosa, foi $\geq 5\%$ (figura 3), pelo fato de que o número de casos apresentado no nosso trabalho não permite identificar se os casos que apresentam expressão $< 5\%$ entram no grupo dos negativos ou representariam outro grupo.

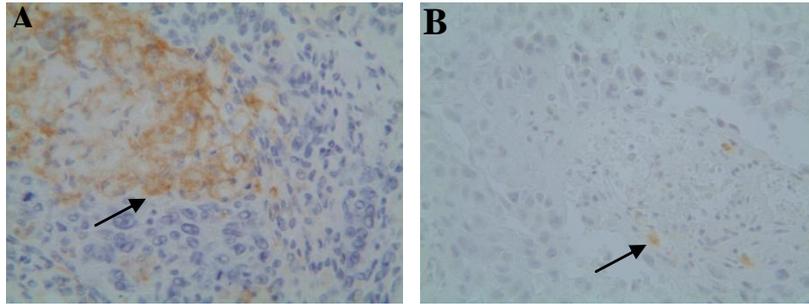


Figura 3: Avaliação da expressão proteica por imunohistoquímica, expressão, membranosa, de PD-L1 \geq 5% (A) e $<$ 5% (B). Células com marcação (setas). Escala: 20 μ m.

De acordo com a literatura, a expressão elevada de PD-L1 pode ser um importante facilitador para o crescimento tumoral e metástases (Chen et al., 2012; Chen & Mellman, 2013; Quezada & Peggs, 2013).

As células tumorais de CECP são conhecidas por exibirem altos níveis de expressão de PD-L1. Estudos pré-clínicos indicam que o bloqueio da interação PD-1 e PD-L1 aumenta a ativação das células T e inibe o crescimento tumoral (Iwai et al., 2002; Strome et al., 2003).

A relevância do *checkpoint* imunológico PD-1: PD-L1 na imunidade contra o câncer é destacado por vários relatórios, demonstrando que o bloqueio de PD-1 ou PD-L1 por anticorpos monoclonais específicos pode inverter o estado anérgico de células T específicas de tumores e, conseqüentemente, aumentar as respostas imunitárias antitumorais (Hirano et al., 2005; Porichis et al., 2011). De acordo com a literatura, nossos resultados mostram que a utilização de terapia, tendo como alvo PD-L1, beneficiaria 9% dos casos avaliados.

A avaliação imunohistoquímica (tabela 9) mostrou expressão de PD-L1 em 9% casos. Dos casos HPV+ 25% e HPV- 4% foram positivos para a expressão de PD-L1.

Quando agrupamos os casos HPV+ e/ou p16+, observamos que apenas esse grupo apresenta casos PD-L1 positivos.

Quanto à localização anatômica cavidade oral, nenhum dos casos foi positivo para expressão de PD-L1.

Quanto à localização anatômica faringe e laringe, 19% dos casos foram positivos para a expressão de PD-L1. Dos casos HPV+ 40% e HPV- 9% foram positivos para a expressão de PD-L1.

Tabela 9: Expressão imunohistoquímica de PD-L1 na faringe e laringe

Localização	Grupo	n	≥5%	<5%	0%
Geral	GERAL	33	9%	12%	79%
	HPV+	8	25%	12,5%	62,5%
	HPV-	25	4%	12%	84%
Geral	HPV+ e/ou p16+	18	17%	11%	72%
	HPV-	15	-	13%	87%
Cavidade oral	GERAL	17	-	18%	82%
	HPV+	3	-	33%	67%
	HPV-	14	-	14%	86%
Faringe e laringe	GERAL	16	19%	6%	75%
	HPV+	5	40%	-	60%
	HPV-	11	9%	9%	82%

5.6 PAINEL DE BIOMARCADORES

Segundo Leemans et al. (2011), ao menos três grupos distintos de CECPs podem ser assinalados: 1) tumores que contém o HPV transcricionalmente ativo (em grande parte proveniente de orofaringe, *p53* selvagem, positivos para mRNA de *E6* e *E7* e com um prognóstico favorável); 2) tumores HPV- com alta instabilidade cromossomal (grande número de alterações numéricas, principalmente aneuplóide e *p53* mutado e de pior prognóstico); 3) tumores HPV- com baixa instabilidade cromossomal (poucas alterações numéricas, quase diplóides, *p53* selvagem e com um prognóstico possivelmente favorável).

De acordo com a literatura, nossos resultados também mostram a distribuição dos casos avaliados em 3 grupos (figura 4).

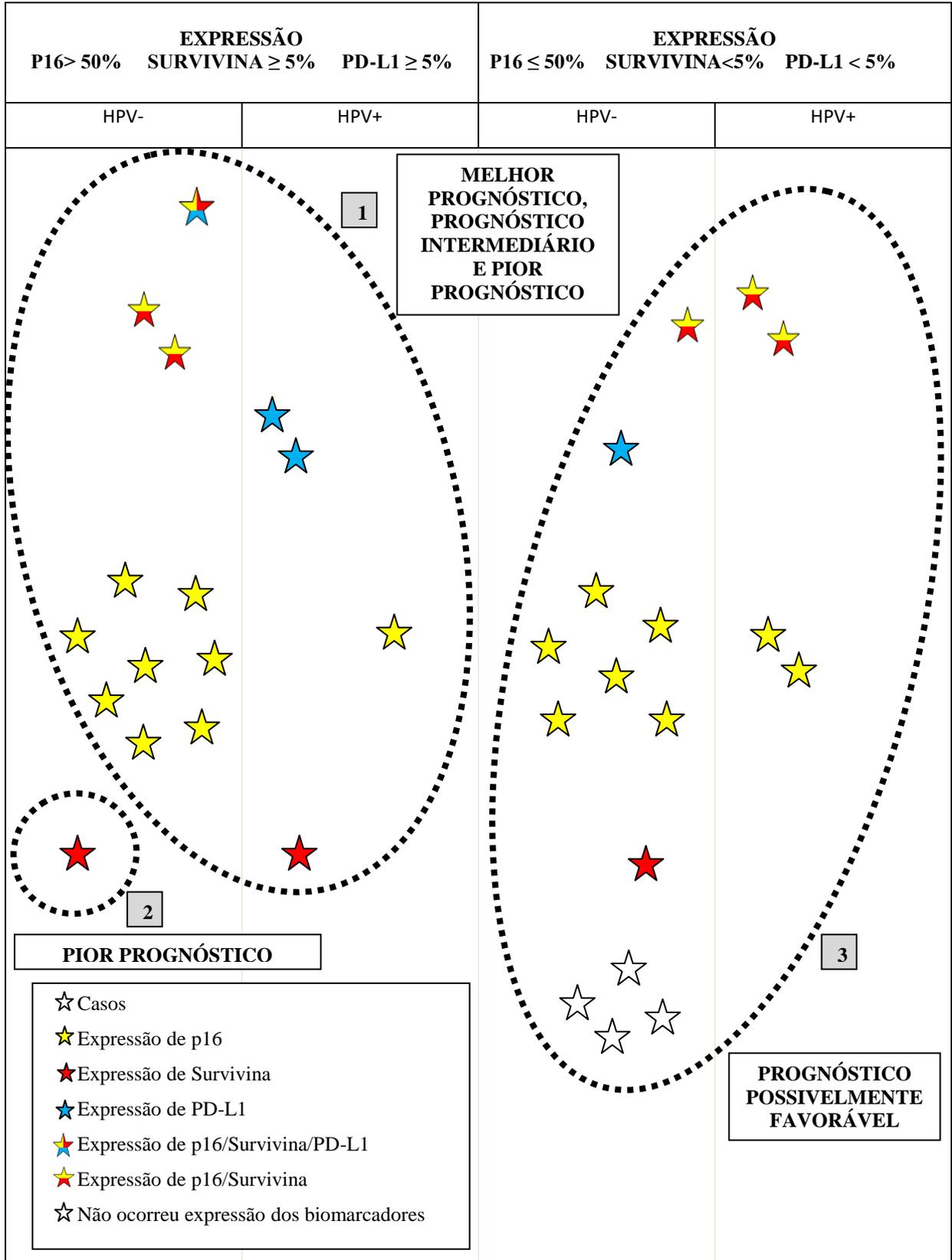


Figura 4: Expressão imunohistoquímica de p16, survivina e PD-L1, nos casos avaliados.

No grupo 1, encontram-se os casos HPV+, e alguns casos HPV- com superexpressão de p16, que pode ser um indicativo da participação da infecção por HPV durante a carcinogênese, porém essa infecção pode não estar mais presente ou a detecção do HPV pode não ter ocorrido, pelo fato de que alguns fatores podem contribuir para a falha na realização da PCR com DNA extraído de material parafinado, como a presença de substâncias inibidoras e principalmente a degradação do DNA.

Segundo a literatura, p16 pode fornecer evidências do potencial maligno de uma lesão e sua superexpressão pode ser considerada um marcador de prognóstico favorável, afetando o comportamento clínico desses tumores (Liang et al., 2012; Lewis, 2012). Nossos resultados apontam que a superexpressão de p16, independentemente, pode ser um indicativo de melhor prognóstico. Segundo Coords et al. (2015), a sobrevivência do CECp é melhorada em pacientes com HPV+/p16+, intermediária em pacientes HPV-/p16+ e mais limitada em pacientes com as combinações de HPV-/p16- ou HPV+/p16-. Porém, novos ensaios são obrigatórios para investigar a sobrevida dos pacientes incluindo aqueles com HPV+/p16- e HPV-/p16.

A ausência ou inativação da proteína p16 parece ser um evento precoce na carcinogênese, resultando em rompimento do controle do ciclo celular, com consequente desenvolvimento do tumor (Mortier et al., 2002; Pérez-Sayáns et al., 2011). Estudos indicam que p16 se torna menos expresso, à medida que aumentam as células envolvidas na atividade tumoral (El-Naggar & Westra, 2012). De acordo com os nossos resultados, a superexpressão de p16 seria provocada pela infecção pelo HPV.

Em células normais, a transcrição de *INKA4* está epigeneticamente reprimida, entretanto, em alguns tumores em humanos, principalmente aqueles causados por HPV de alto risco, a expressão de *INKA4* ocorre em altos níveis (McLaughlin-Drubin et al., 2013). A oncoproteína viral E7 inibe a atividade da pRB por ligar-se a esta proteína, liberando o fator E2F, desencadeando o processo de replicação do DNA e aumentando a proliferação das células do epitélio infectado. O gene *INKA4*, por sua vez, tem sua expressão controlada por *feedback* negativo exercido pela pRB. Assim, a inativação de pRB por E7 resulta no acúmulo de p16 nas células infectadas (Ferraz et al., 2012; Pannone et al., 2012; Oguejiofor et al., 2013).

A alta expressão de p16 nos tumores benignos, associados ao HPV, demonstra que essa proteína está possivelmente desempenhando seu papel na tentativa de interromper a proliferação tumoral, o que resultaria em melhor prognóstico para a doença (Wittekindt et al., 2012).

Nossos resultados corroboram com a literatura, mostrando que, para compreender os mecanismos de modificação do ciclo celular promovidos pelo HPV, tem sido proposto utilizar p16 como um indicador da participação viral na carcinogênese dos tumores de origem epitelial. No entanto, até o momento não há um consenso estabelecido para esta aplicação (Zaravinos, 2014). Por ser um assunto de extremo interesse, vários grupos de pesquisa estão tentando elucidar esse fato.

A relação entre a superexpressão de p16 e presença de infecção por HPV não foi observada em alguns dos casos avaliados, podendo indicar duas hipóteses: a não participação do HPV no processo de carcinogênese, estando o HPV ali apenas como uma “infecção secundária”, tendo como via carcinogênica real o tabagismo e/ou etilismo ou o sinergismo entre as vias carcinogênicas HPV+ e HPV- (tabagismo/etilismo), sendo os primeiros predominantes na seleção de clones neoplásicos.

Segundo a literatura, a expressão de survivina e p16 como marcador substituto para o estado de HPV foi analisada por imunohistoquímica em um estudo realizado por Preuss et al. (2008) e mostrou que o acúmulo nuclear de survivina correlacionou-se com a carcinogênese independente do HPV e foi um preditor independente de baixa sobrevida em pacientes com carcinomas epidermóides orofaríngeos. Nossos resultados, apoiam a hipótese contrária, indicando que a expressão de survivina ocorre preferencialmente nos casos HPV+. Estudos sobre a relação entre a expressão de survivina e presença de HPV sugerem que o HPV pode ter um efeito direto ou indireto na regulação dos níveis de expressão de survivina. Carcinomas epidermóides orais HPV-, caracterizados por altos níveis de expressão de survivina, poderiam ter uma pior resposta clínica em comparação com carcinomas epidermóides orais HPV+ caracterizados por baixos níveis de expressão de survivina. Por outro lado, a expressão de survivina em carcinomas epidermóides orais HPV+ pode ser útil para a detecção de lesões com comportamento desfavorável, similar ao dos cânceres orais HPV-, que quase sempre têm uma expressão elevada de survivina. Lesões de carcinomas epidermóides orais HPV+, com níveis mais elevados de expressão de survivina, poderiam ter uma pior evolução clínica: a survivina consegue parar a apoptose e promover a transformação celular. Em estudos retrospectivos a expressão de survivina está correlacionada com a redução da sobrevida global em carcinomas epidermóides orais (Lo Muzio et al., 2005).

Os nossos resultados mostram que a expressão de PD-L1 foi positiva, nos casos HPV+, sugerindo uma associação entre a presença da infecção por HPV e expressão de PD-L1. Alguns estudos sugerem que os tumores induzidos pela presença de HPV usam as vias

PD-1/PD-L1 como um mecanismo adaptativo contra a imunidade antitumoral (Mirghani et al., 2015b).

Existe a hipótese de que os cânceres orofaríngeos, associados ao HPV, expressam PD-L1 como um modo de evasão imunológica e os tumores que expressam PD-L1 apresentaram maior probabilidade de serem HPV positivos, apontando assim para o papel potencial desta via como terapêutica no CECP associado ao HPV (Ukpo et al., 2013). No entanto, o estudo realizado por Kim et al. (2016) mostrou que PD-L1 foi altamente expressa em carcinoma epidermoide de orofaringe, mas não houve correlação entre expressão de PD-L1 e estado de HPV.

A evasão imune através do eixo PD1/PDL1 é relevante para ambas as etiologias: viral (HPV) e não viral (*p53*) do CECP (Feldman et al., 2014). No entanto, não está claro se a via PD-1: PD-L1 desempenha um papel maior no CECP HPV+ em comparação com o CECP HPV- (Kreimer et al., 2005).

No grupo 2, da nossa casuística, encontram-se os casos de CECP HPV- positivos para expressão de survivina, indicando pior prognóstico e no grupo 3 os CECPs HPV+ e HPV-, onde não ocorreu a expressão dos biomarcadores ou a expressão foi considerada fraca para p16 e negativa para survivina e PD-L1, sugerindo um prognóstico possivelmente favorável.

Segundo a literatura os CECPs podem ser divididos em HPV- e HPV+, uma vez que apresentam fatores de risco, oncogênese e prognósticos distintos (Syrjanen, 2010; Mirghani et al., 2015a). De acordo com a revisão realizada por Leemans et al. (2011), os carcinomas HPV- estão associados a um mau prognóstico e os carcinomas HPV+ estão associados a um bom prognóstico. Nosso painel de biomarcadores mostrou que os CECPs podem ser agrupados, quanto ao prognóstico, em uma terceira categoria, que se encontra entre os carcinomas HPV+ e HPV-, indicando prognóstico intermediário (figura 5).



Figura 5: Painel de biomarcadores e prognóstico dos CECPs.

Nossos resultados mostram a distribuição dos casos avaliados em 3 grupos: no grupo 1, quando os tumores apresentam superexpressão de p16, independentemente, pode ser um indicativo de melhor prognóstico, similar aos cânceres HPV+, pelo fato dos nossos resultados apontarem que a superexpressão de p16 seria provocada pela infecção pelo HPV, indicando a via carcinogênica HPV+. A superexpressão de p16, em conjunto com a expressão de survivina e/ou PD-L1, indica um comportamento intermediário entre os cânceres HPV+ e HPV- e a expressão de survivina e/ou PD-L1 em carcinomas HPV+/p16- podem indicar lesões com comportamento desfavorável similar ao cânceres HPV-, apoiando a hipótese de sinergismo entre o consumo de tabaco e álcool e a presença do HPV no desenvolvimento do CECP. No grupo 2, os casos HPV-, positivos para expressão de survivina, indicam pior prognóstico e no grupo 3, os CECPs que não apresentam a expressão dos biomarcadores ou a expressão é considerada fraca para p16 e negativa para survivina e PD-L1, indicam um prognóstico possivelmente favorável.

5.7 HPV E CARCINOGENESE EM CABEÇA E PESCOÇO

Segundo a literatura, quando se trata de CECP, estudos têm mostrado que o HPV ainda não tem sua participação bem estabelecida (Ferraro et al., 2011). Com os nossos resultados, levantamos algumas hipóteses quanto a influência do HPV na expressão dos biomarcadores p16, survivina e PD-L1 na carcinogênese de CECP, que podem contribuir para o entendimento da participação do HPV neste tipo de câncer.

Estudos mostram que o perfil do paciente HPV+ difere do HPV- em vários aspectos significativos, incluindo o teor molecular do tumor, história sexual do paciente, ausência de fatores de risco clássicos e prognóstico clínico (van Monsjou et al., 2010; Zushi et al., 2011). Nossos resultados apontam a hipótese de sinergismo entre os fatores envolvidos na carcinogênese de CECP.

Muitos tumores que ocupam o mesmo sítio anatômico e apresentam estágio semelhante, muitas vezes respondem de forma muito variada ao tratamento. Sendo assim, o estudo de biomarcadores que indiquem a progressão tumoral ou possam predizer a resposta ao tratamento tem sido amplamente explorado. Desta forma, busca-se um tratamento mais individualizado, evitando o emprego de terapias muito agressivas para casos que apresentam bom prognóstico, reduzindo assim as complicações decorrentes do tratamento antineoplásico. Por outro lado, procura-se intensificar o tratamento em tumores cujo comportamento

biológico mostra-se mais agressivo, aumentando as chances de cura e a sobrevida dos indivíduos (Ang et al., 2010).

Os biomarcadores estudados neste trabalho podem ser úteis na terapêutica do CECP, visto que, segundo a literatura pensa-se que a terapêutica para CECP na presença e na ausência de HPV deve ser vista de forma diferente, dado existirem diferenças significativas nos dois cânceres (Kim et al., 2015). A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes a esta doença é fundamental para o desenvolvimento de terapias específicas e individualização do tratamento baseado na biologia do tumor (Descamps et al., 2014).

6. CONCLUSÕES

- Os tumores HPV+ podem ser encontrados ao longo de cada local do trato aerodigestivo superior, podendo ter infecções por um único tipo de HPV ou por múltiplos tipos.
- Existe a hipótese de sinergismo entre as vias carcinogênicas HPV+ e HPV- (tabagismo/etilismo) no desenvolvimento do CECP.
- A superexpressão de p16 pode ser um indicativo da participação da infecção por HPV no processo de carcinogênese.
- A relação entre a superexpressão de p16 e presença de infecção por HPV não foi observada em alguns dos casos avaliados, podendo indicar: falha na realização da PCR, não detectando a presença do HPV; a não participação do HPV no processo de carcinogênese; o sinergismo entre as vias carcinogênicas HPV+ e HPV- (tabagismo/etilismo).
- A superexpressão de p16, independentemente, pode ser um indicativo de melhor prognóstico, similar aos cânceres HPV+, pelo fato dos nossos resultados apontarem que a superexpressão de p16 seria provocada pela infecção pelo HPV, indicando a via carcinogênica HPV+.
- A superexpressão de p16, em conjunto com a expressão de survivina e/ou PD-L1, indicam um comportamento intermediário entre os cânceres HPV+ e HPV-.
- A expressão de survivina e/ou PD-L1 em carcinomas HPV+ podem indicar lesões com comportamento desfavorável, similar ao cânceres HPV-.
- Existe a hipótese de uma associação entre a presença da infecção por HPV e a expressão de PD-L1.
- Nossos resultados apontam uma ligação entre a expressão de survivina e CECPs HPV+.
- Foi encontrado um número significativo de casos positivos para PD-L1, os quais podem ser beneficiados com a utilização de terapia tendo como alvo PD-L1.
- p16, survivina e PD-L1 são indicativos da via carcinogênica HPV+, e podem predizer se houve sinergismo entre as vias carcinogênicas bem como indicar o comportamento dos tumores, entretanto não devem ser utilizados isoladamente, incluindo a PCR para HPV.

- Os biomarcadores avaliados neste trabalho podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, sendo necessária a obtenção de um maior número de casos e de informações sobre a expressão desses biomarcadores.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A. K. et al. (2007). **Cellular and Molecular Immunology**. 6 ed. Estados Unidos da América: Saunders. 564 p.
- Adelstein, D. J. & Rodriguez, C. P. (2010). Human papillomavirus: Changing paradigms in oropharyngeal cancer. **Curr Oncol Rep**. 12(2):115-20.
- Adrien J., et al. (2014). Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. **Oral Oncol**. 50(2):90-7.
- Alam, M. J. & Rahman, M. F. (2016). Herd immunity: a brief review. **Mymensingh Med J**. 25(2), 392-395.
- Albring, L., et al. (2006). O câncer do colo do útero , o Papilomavírus Humano (HPV) e seus fatores de risco e as mulheres indígenas Guarani : estudo de revisão The cervical cancer , the Human Papillomavirus and its risk factors and the Guarani indigenous women : a review. **Rev. Bras. Anal. Clin**. 38(2):87-90.
- Almeida L. B. M., et al. (2015). Hábitos alimentares de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Perspectivas Médicas**. 26(2):5-13.
- Altieri, D. C. (2013). Targeting survivin in cancer. **Cancer Lett**.332(2):225-8.
- Alvarenga, L. M., et al. (2008). Avaliação Epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital Universitário do noroeste do estado de São Paulo. **Rev. Bras. Otorrinol**. 74(1): 68-73.
- Ambrosini G., et al. (1997). A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [abstract]. **Nat Med**. 3(8):917-21.
- Anantharaman, D., et al. (2014). Genetic variants in nicotine addiction and alcohol metabolism genes, oral cancer risk and the propensity to smoke and drink alcohol: A replication study in India. **PLoS One**. 9(2):e88240.
- Andreotti, M. (2004). Atividade Ocupacional e Câncer da Cavidade Bucal e Orofaringe. **Dissertação de mestrado**. Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- ANG, K. K. et al. (2010). Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. **N Engl J Med**. 363(1):24-35.
- Baboci, L., et al. (2016). Low prevalence of HPV-driven head and neck squamous cell carcinoma in North-East Italy. **Papillomavirus Research**. 2: 133 - 40.
- Badoual, C., et al. (2013). PD-1 expressing tumor-infiltrating T cells are a favorable prognostic biomarker in HPV-associated head and neck cancer. **Cancer Res**.73(1):128-38.

Barbosa, F., et al. (2010). **Sequenciamento genético e análise molecular do Papilomavírus humano 16 isolado na Amazônia**. Resumo apresentado no 56º Congresso Brasileiro de Genética. ISBN 978-85-89109-06-2. Guarujá – SP.

Bast, R. C., et al. (2000). **Cancer medicine**. 5th ed. Canada: BC Decker.

Bellmunt, J., et al. (2015). Association of PD-L1 expression on tumor-infiltrating mononuclear cells and overall survival in patients with urothelial carcinoma. **Ann Oncol**. 26(4):812-7.

Benson, E., et al. (2014). The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**. 50(6): 565-574.

Bernard, H. U. (2004). Established and potential strategies against papillomavirus infections. **J Antimicrob Chemother**. 53(2):137-9.

Bernard, H.U., et al. (2010). Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. **Virology**. 401(1):70-9.

Betioli, J., et al. (2013). Impact of HPV infection on the development of head and neck cancer. **Braz J Med Biol Res**. 46(3):217-26.

Bhandari, M. Siva S. (2008). Re: Radical nephrectomy for pT1a renal masses may be associated with decreased overall survival compared with partial nephrectomy R. H. Thompson, S. A. Boorjian, C. M. Lohse, B. C. Leibovich, E. D. Kwon, J. C. Cheville and M. L. Blute *J Urol* 2008; 179: 468-473. **J Urol**. 180(4):1568-9.

Biron, V. L., et al. (2013). The impact of clinical versus pathological staging in oral cavity carcinoma - A multi-institutional analysis of survival. **J Otolaryngol - Head Neck Surg**. 42:2–5.

Blank, C. & Mackensen, A. (2007). Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. **Cancer Immunol Immunother**. 56(5):739-45.

Boccardo, E. (2010). HPV-mediated genome instability: at the roots of cervical carcinogenesis. **Cytogenet Genome Res**. 128(1-3):57-65.

Boland, J. M., et al. (2013). Tumor B7-H1 and B7-H3 expression in squamous cell carcinoma of the lung. **Clin. Lung Cancer**. 14(2):157-63.

Bose, A., et al. (2006). Interferon alpha2b augments suppressed immune functions in tobacco-related head and neck squamous cell carcinoma patients by modulating cytokine signaling. **Oral Oncol**. 42(2): 161-71.

Bose, A., et al. (2008). Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. **Cancer Immun**. 8: 10.

- Bottalico, D., et al. (2011). The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. **J Infect Dis.** 204(5):787-92.
- Braakhuis, B. J., et al. (2009). Human papilloma virus in head and neck cancer: the need for a standardised assay to assess the full clinical importance. **Eur J Cancer.** 45(17):2935-9.
- Brasil (2013). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral do Programa Nacional de Imunizações. **Informe técnico sobre a vacina contra o papilomavírus humano (HPV).**
- Brasil (2014). Ministério de Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional do Câncer.** p. 1–126.
- Brasileiro Filho, G. (2009). **Bogliolo - Patologia Geral.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 378 p.
- Bray, F., et al. (2002). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 1995. **Eur J Cancer.** 38(1):99-166.
- Budach, V. (2010). TPF sequential therapy: when and for whom? **Oncologist.** 15(3), 13-18.
- Burk, R. D., et al. (2013). Human papillomavirus genome variants. **Virology.** 445(1-2):232-43.
- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. **Prog Exp Tumor Res.** 13: 1 – 27.
- Carestiato, F. N., et al. (2006). Analysis of molecular biology techniques for the diagnosis of human papillomavirus infection and cervical cancer prevention. **Rev Soc Bras Med Trop.** 39(5):428-32.
- Carmo, E. F. S. & Fiorini, A. (2007). Principais técnicas moleculares para detecção do papilomavírus humano. **Sabios-Revista de Saúde e Biologia.** 2(1): 29-31.
- Carrard, V. C., et al. (2008). Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 54(1): 49-56.
- Castellsagué, X., et al. (2001). Human papillomavirus genotypes in rural Mozambique. **Lancet.** 358(9291):1429-30.
- Castle, P. E. & Maza, M. (2016). Prophylactic HPV vaccination: past, present, and future. **Epidemiol Infect.** 144(3): 449-468.
- Castro, B., et al. (2014). Rastreio do câncer do colo do útero: limites etários, periodicidade e exame ideal: revisão da evidência recente e comparação com o indicador de desempenho avaliado em Portugal. **Ciência & Saúde Coletiva.** 19(4):1113-1122.
- Cerdeira, C. R., et al. (2009). Human Papilloma Virus (HPV) and Genital Cancer. **The Open Dermatology Journal.** 3:117-128.

Chambers, M. S., et al. (2005). A Treatment Approach to Treating Head and Neck Cancer. *Cancer Care Connect*. **Disponível (online)**
http://www.cancercare.org/pdf/booklets/ccc_head_neck.pdf (23 de Março de 2016).

Chattopadhyay, A., et al. (2015). Human papillomavirus and oral cancer: a primer for dental public health professionals. **Community Dental Health**.32(2):117-28.

Chaturvedi, A. K., et al. (2013). Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. **J Clin Oncol**. 31(36):4550-9.

Chaudhary, A.K., et al. (2009). Role of human papillomavirus and its detection is potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. **Head Neck Oncol**. 1:22.

Chen, Z., et al. (1999). Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. **Clin Cancer Res**. 5(6): 1369-79.

Chen, D.S., et al. (2012). Molecular pathways: next-generation immunotherapy--inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. **Clin Cancer Res**. 18(24):6580-7.

Chen, D. S. & Mellman, I. (2013). Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity**.39(1):1-10.

Chen, L. & Xue, H. (2015). Anti-PD1/PD-L1 therapy of human cancer: past, present and future. **J Clin Invest**. 125(9):3384-91.

Chi, A. C., et al. (2015). Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma - an update. **CA Cancer J Clin**. 65(5):401-21.

Cho, Y. A., et al. (2011). Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**.47(12):1148-53.

Chow, E. P., et al. (2017). Quadrivalent vaccine-targeted human papillomavirus genotypes in heterosexual men after the Australian female human papillomavirus vaccination programme: a retrospective observational study. **Lancet Infect Dis**. 17(1):68-77.

Chung, C. H., et al. (2014). Epidemiology of oral human papillomavirus infection. **Oral Oncol**.50(5):364-9.

Church, D. N. & Talbot, D. C. (2012). Survivin in solid tumors: rationale for development of inhibitors. **Curr Oncol Rep**. 14(2):120-8.

Ciesielska, U., et al. (2012). The role of human papillomavirus in the malignant transformation of cervix epithelial cells and the importance of vaccination against this virus. **Adv Clin Exp Med**. 21(2):235-44.

Ciesielska, U., et al. (2017). Expression of Cell Cycle-related Proteins p16, p27 and Ki-67 Proliferating Marker in Laryngeal Squamous Cell Carcinomas and in Laryngeal Papillomas. **Anticancer Res**. 37(5):2407-2415.

- Combes, J.D. & Franceschi, S. (2014). Role of human papillomavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers. **Oral Oncol.** 50(5):370-9.
- Coordes, A., et al. (2016). Meta-analysis of survival in patients with HNSCC discriminates risk depending on combined HPV and p16 status. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 273(8):2157-69.
- Cotran, R., et al. (1999). **Pathological basis of disease.** 6ª Edição. Saunders Company.
- Crusius, K., et al. (1997). Enhancement of EGF- and PMA-mediated MAP kinase activation in cells expressing the human papillomavirus type 16 E5 protein. **Oncogene.** 15(12):1437-44.
- Curado, M. P. (2008). Câncer de Cabeça e Pescoço- Parte I- Princípios Básicos. In: Parisi O, Kowalski L P, Lehn C. **Câncer de Cabeça e Pescoço: diagnóstico e tratamento.** São Paulo. Âmbito Editores. p.7-10.
- Cutts, F. T., et al. (2007). Human papillomavirus and HPV vaccines: a review. **Bull World Health Organ.** 85(9), 649-732.
- D'Souza, G., et al. (2014). Oral human papillomavirus (HPV) infection among unvaccinated high-risk young adults. **Cancers (Basel).**6(3):1691-704.
- Dahlstrom, K. R., et al. (2015). Socioeconomic characteristics of patients with oropharyngeal carcinoma according to tumor HPV status, patient smoking status, and sexual behavior. **Oral Oncology.** 51(9), 832-838.
- Daley, E., et al. (2014). Prevention of HPV related oral cancer : assessing dentists' readiness. Public Health. **Elsevier Ltd.** 128(3):231–8.
- Dayyani, F., et al. (2010). Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). **Head Neck Oncol.** 2:15.
- de Villiers, E.M., et al. (2004). Classification of papillomaviruses. **Virology.** 324(1):17-27.
- de Vissers, K.E. & Coussens, L.M. (2005). The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. **Cancer Immunol Immunother.**54(11):1143-52.
- Descamps, G., et al. (2014). Proteomic Study of HPV-Positive Head and Neck Cancers: Preliminary Results. **Biomed Res Int.** 2014:430906.
- Diamandis, E. P., et al. (2002). **Tumor markers: Physiology, Pathobiology, Technology and Clinical Application.** Washington, DC: AACCC Press. v. 1. 541 pp.
- Didelot-Rosseau, M-N., et al. (2006). Comparison of INNO-LiPA HPV genotyping v2 with PCR product subcloning and sequencing for identification of genital human papillomavirus genotypes in Africa women. **Journal of Virological Methods.** 135(2):181-5.
- Disbrow, G.L., et al. (2005). Endoplasmic reticulum-localized human papillomavirus type 16 E5 protein alters endosomal pH but not trans-Golgi pH. **J Virol.** 79(9):5839-46.

- Döbrossy, L. (2005). Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. **Cancer Metastasis Rev.** 24(1):9-17.
- Dok, R., et al. (2014). p16INK4a impairs homologous recombination mediated DNA repair papillomavirus-positive head and neck tumors. **Cancer Res.**74(6):1739-51.
- Dolan, D. E. & Gupta, S. (2014). PD-1 Pathway Inhibitors: Changing the Landscape of Cancer Immunotherapy. **Cancer Control.**21(3):231-7.
- Doll, R. & Hill, A. B. (1950). Smoking and Carcinoma of the Lung. **Preliminary Report. Br Med J.** 2(4682):739-48.
- Dong, H., et al. (2002) Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat Med.** 8(8):793-800.
- Dong, Y, et al. (2002). Survivin expression in laryngeal squamous cell carcinomas and its prognostic implications. **Anticancer Res.** 22(4):2377-83.
- Doorbar, J. (2005). The papillomavirus life cycle. **J Clin Virol.**32 Suppl 1:S7-15.
- D'Souza, G., et al. (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N Engl J Med.** 356(19):1944-56.
- Dubreix-Daloz, L., et al. (2008). IAPs: More than just inhibitors of apoptosis proteins. **Cell Cycle.** 7(8):1036-46.
- Duffy, M. J., et al. (2007). Survivin: a promising tumor biomarker. **Cancer Lett.** 249(1):49-60.
- Dunn, G.P., et al. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol.** 3(11): 991-998.
- El-Naggar, A.K. & Westra, W. H. et al. (2012). p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. **Head Neck.** 34(4):459-61.
- Engels, K., et al. (2007). Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. **J Pathol.** 211(5):532-40.
- Enomoto, L. M., et al. (2016). Trends in the incidence of oropharyngeal cancers in the United States. **Otolaryngol - Head and Neck Surg.** 154(6):1034-1340.
- Fakhry, C., & D'Souza, G. (2013). Discussing the diagnosis of HPV-OSCC: common questions and answers. **Oral Oncology.** 49(9):863-871.
- Fakhry, C., et al. (2014). HPV and head and neck cancers: state-of-the-science. **Oral Oncol.**50(5):353-5.

- Federico, B., et al. Trends in educational inequalities in smoking in northern, mid and southern Italy, 1980-2000. **Prev Med.** 39(5):919-26.
- Feldman, R., et al. (2014). PD1 and PDL1 in HPV + and HPV -/TP53 mutated head and neck squamous cell carcinomas. **Annals of Oncology**25. (Supplement 4): iv340–iv356.
- Feller, L. L., et al. (2013). Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. **Cancer Cell Int.** 13(1):31.
- Ferlay, J., et al. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer.** 136(5):E359-86.
- Ferraro, C. T. L., et al. (2011). Infecção oral pelo HPV e lesões epiteliais proliferativas associadas. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.** 47(4):451–459.
- Ferraz, L. D. C., et al. (2012). Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: seleção de marcadores biológicos. **Journal of the Health Sciences Institute.** 30(2):107–111.
- Fisher, D. E. (1994). Apoptosis in câncer therapy: crossing the threshold. **Cell.** 78(4):539-42.
- Flint, S. J., et al. (2009). **Principles of Virology- Pathogenesis and Control.** 3rd ed. Estados Unidos da América, Washington DC.
- Francis, G., et al. (2013). Accumulation of inactive p53 protein in oral squamous cell carcinoma: stabilization by protein interaction. **Eur J Oral Sci.** 121(1):21-8.
- Freier, K., et al. (2007). High survivin expression is associated with favorable outcome in advanced primary oral squamous cell carcinoma after radiation therapy. **Int J Cancer.** 120(4):942-6.
- Freitas, D. A. *et al.* (2011). Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço. **Revista CEFAC,** São Paulo. 13(6):1103-1108.
- Freudlsperger, C., et al. (2011). EGFR-PI3K-AKT-mTOR Signaling in head and neck squamous cell carcinomas – attractive targets for molecular-oriented therapy. **Expert Opin Ther Targets.** 15(1): 63-74.
- Fukuda, S. & Pelus, L. (2006) Survivin, a cancer target with na emerging role in normal adult tissues. **Mol Cancer Ther.** 5(5): 1087-98.
- Fukuda, Y., et al. (2005). Socioeconomic pattern of smoking in Japan: income inequality and gender and age differences. **Ann Epidemiol.** 15(5):365-72.
- Galani, E., & Christodoulou, C., (2009). Human papilloma viruses and cancer in the post vaccine era. **Clin Microbiol Infect.** 15(11):977-81.
- Galbiatti, A. L., et al. (2013). Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Braz J Otorhinolaryngol.** 79(2):239-47.

Gandarillas, A. (2012). The mysterious human epidermal cell cycle, or an oncogene-induced differentiation checkpoint. **Cell Cycle**. 11(24):4507-16.

Garg, H., et al. (2016). Survivin: a unique target for tumor therapy. **Cancer Cell Int**. 16:49.
Garland, S. M. (2002). Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. **Pathology**. 2002 May;34(3):213-24.

Gillison, M. L., et al. (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst**. 92(9):709-20.

Gillison, M. L., et al. (2012). Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. **JAMA**. 307(7):693-703.

Giovanelli, L., et al. (2002). Human papilloma virus DNA in oral mucosa lesions. **J Infect Dis**. 185(6):833-6.

Globocan (2012). Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. **Disponível (online)** <<http://globocan.iarc.fr/>>. (24 de janeiro de 2017).

Godoy A, Mandelli J, Oliveira F, Calegari S, Moura L, Serafini E (2008). p16INK4 expression in precursor lesions of squamous cell cervical cancer related to the presence of HPV-DNA. **Braz J Med Biol Res**.,41(7):583-8.

Goon, P. K. C., et al. (2009). HPV & head and neck cancer: a descriptive update. **Head Neck Oncol**. 1:36.

Gravitt, P. E., et al. (2000). Improved amplification of genital human papillomaviruses. **J Clin Microbiol**. 38(1):357-61.

Gulley, M. L., et al. (1998). Nasopharyngeal carcinomas frequently lack the p16/MTS1 tumor suppressor protein but consistently express the retinoblastoma gene product. **Am J Pathol**. 152(4):865-9.

Gültekin, S. E., et al. (2015). P16 (INK 4a) and Ki-67 expression in human papilloma virus-related head and neck mucosal lesions. **Invest Clin**. 56(1):47-59.

Haddad, R., et al. (2008). Multidisciplinary approach to cancer treatment: focus on head and neck cancer. **Dent Clin North Am**. 52(1):1-17, vii.

Han, C. P., et al. (2008). Nuclear Receptor Interaction Protein (NRIP) expression assay using human tissue microarray and immunohistochemistry technology confirming nuclear localization. **J Exp & Clin Cancer Res**. 27:25.

Han, C. P., et al. (2009). Scoring of p16^{INK4a} immunohistochemistry based on independent nuclear staining alone can sufficiently distinguish between endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study. **Modern pathology** 22(6): 797-806.

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. **Cell**. 100(1):57-70.

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**. 144(5):646-74.
- Hariri, S., (2011). Chapter 5: Human Papillomavirus. **VPD Surveillance Manual**. (5):1-5.
- Harley, C. B., et al. (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. **Nature**. 345(6274):458-60.
- Harper, D. M. & Vierthaler, S. L. (2011). Next Generation Cancer Protection: The Bivalent HPV Vaccine for Females. ISRN obstetrics and gynecology. **ISRN Obstet Gynecol**. 2011:457204.
- Hebner, C. M. & Laimins, L. A. (2006). Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. **Rev Med Virol**. 16(2):83-97.
- Hennessey, P. T., et al. (2009). Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. **J Dent Res**. 88(4):300-6.
- Herchenhorn, D. & Dias, F. L. (2004). Advances in radiochemotherapy in the treatment of head and neck cancer. **Rev Hosp Clin Fac Med Univ São Paulo**. 59(1):39-46.
- Heroui, A. D., (2013). Multiple Cancers of the Head and Neck. **Maedica J Clin Med**.8(1):80-5.
- Herrero, R., et al. (2003). Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for research on cancer multicenter study. **J Natl Cancer Inst**. 95(23), 1772-1783.
- Herrero, R., et al. (2013). Reduced prevalence of oral human papillomavirus (HPV) 4 years after bivalent HPV vaccination in a randomized clinical trial in Costa Rica. **PLoS One**. 8(7):e68329.
- Hirano, F., et al. (2005). Blockade of B7-H1 and PD-1 by monoclonal antibodies potentiates cancer therapeutic immunity. **Cancer Res**.65(3):1089-96.
- Hitt, R. & Echarri, M. J. (2006). Molecular biology in head and neck cancer. **Clin Transl Oncol**. 8(11):776-9.
- Hoffman, W. H., et al. (2002). Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. **J Biol Chem**. 277(5):3247-57.
- Homann, N., et al. (2000). Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. **Carcinogenesis**. 21(4):663-8.
- Homet Moreno, B. & Ribas A. (2015). Antiprogrammed cell death protein1/ligand-1 therapy in different cancers. **Br J Cancer**. 112(9):1421-7.
- Hong, A., et al. (2016). Relationships between p53 mutation, HPV status and outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Radiother Oncol**. 118(2), 342-349.

- Hsu, M. C., et al. (2010). Increase of programmed death-1-expressing intratumoral CD8 T cells predicts a poor prognosis for nasopharyngeal carcinoma. **Mod Pathol.**23(10):1393-403.
- Hubbard, R. A. (2003). Human Papillomavirus Testing Methods. **Archives of pathology & laboratory medicine.**127(8):940-945.
- IARC (1995). Human Papillomaviruses. **IARC Monogr.** Eval. Carcinog. Risks Hum. 64:1–428.
- INCA (2017). Câncer. Disponível (online) <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. (18 de janeiro de 2017).
- Invernizzi, R., et al. (2006). Survivin expression, apoptosis and proliferation in chronic myelomonocytic leukemia. **Eur J Haematol.** 76(6):494-501.
- Iwai, Y., et al. (2002). Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. **Proc Natl Acad Sci.**99(19):12293-7.
- Janeway, C., et al. (2008). Janeway's Immunobiology. 7 ed. Estados Unidos da América: **Garland Science.** Taylor & Francis Group, LLC.
- Jeon, S. & Lambert, P. F. (1995). Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 92(5):1654-8.
- Ji, M., et al. (2015). PD-1/PD-L1 pathway in non-small-cell lung cancer and its relation with EGFR mutation. **J Transl Med.**13:5.
- Jordan, R. C. (2012). Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. **Am J Surg Pathol.** 36(7):945–54.
- Kakavand, H., et al. (2015). PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes define different subsets of MAPK inhibitor-treated melanoma patients. **Clin Cancer Res.**21(14):3140-8.
- Kamangar, F., et al. (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **J. Clin. Oncol.** 24(14):2137-50.
- Karia P. S., et al. (2013). Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. **J Am Acad Dermatol.** 68(6):957-66.
- Kim, N. W., et al. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science.** 266(5193):2011-5.
- Kim, J. W. & Eder, J. P. (2014). Prospects for targeting PD-1 and PDL1 in various tumor types. **Oncology** (Williston Park). 28 Suppl 3:15-28.

Kim, K. Y., et al. (2015). Identification of human papillomavirus status specific biomarker in head and neck cancer. **Head Neck**. 37(9):1310-8.

Kim, H. S., et al. (2016). Association between PD-L1 and HPV Status and the Prognostic Value of PD-L1 in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Res Treat**. 48(2):527-36.

Kindt, T. J., et al. (2008). **Imunologia de Kuby**. 6ª edição, São Paulo, Artmed.

Kok, L. F., et al., (2010). Comparing the scoring mechanisms of p16 INK4a immunohistochemistry based on independent nucleic stains and independent cytoplasmic stains in distinguishing between endocervical and endometrial adenocarcinomas in a tissue microarray study. **Arch Gynecol Obstet**. 281(2):293-300.

Kreimer, A. R., et al. (2005). . Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 14(2):467-75.

Kreimer, A.R., et al. (2013). Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. **The Lancet**. 382(9895), 877-887.

Kreimer, A. R. (2014). Prospects for prevention of HPV-driven oropharynx cancer. **Oral Oncology**. 50(6), 555-559.

Kumar, S.& Biswas, M. (2015). HPV vaccine: current status and future directions. **Med J Armed Forces India**. 2015 Apr;71(2):171-7.

Kurdgelashvili, G., et al. (2013). Incidence of potentially human papillomavirus-related neoplasms in the United States, 1978 to 2007. **Cancer**. 119(12):2291-9.

Lai, Y. J., et al. (2014). Expression of survivin and p53 modulates honokiol-induced apoptosis in colorectal cancer cells. **J Cell Biochem**. 115(11):1888-99.

Lajer, C. B.& von Buchwald, C. (2010). The role of human papillomavirus in head and neck cancer. **APMIS**. 2010 Jun;118(6-7):510-9.

Lancellotti, C. L. P., et al. (2000). **Diagnóstico laboratorial**. In: Carvalho JJM, Oyakawa N. I Consenso Brasileiro do HPV, 1ª edição, São Paulo: BG Cultural; 4: 45- 60.

Latorre, M. R. D. O., et al., (2005). **Câncer de Pulmão**. In: Aldrighi JM, Buchalla CM, Cardoso MRA. Epidemiologia dos Agravos à Saúde da Mulher. S.Paulo, Ed. Atheneu. cap.11, 101-110.

Lee, S. H., et al. (2015). Human papillomavirus 16 (HPV16) enhances tumor growth and cancer stemness of HPV-negative oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma cells via miR181 regulation. **Papillomavirus Res**. 1:116-125.

- Leemans, C. R., et al. (2011). The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**. 11(1):9-22.
- Leite, K. R. M. & Lopes, L. H. C. (2000). **Campo de cancerização e clonalidade**. In: PARISE-JR, O. (Ed.). *Câncer de Boca: Aspectos Básicos e Terapêuticos*. São Paulo: Sarvier. p. 29–33.
- Leitzmann, M. F., et al. (2008). Physical activity and head and neck cancer risk. **Cancer Causes and Control**. 19(10):1391-9.
- Lewis, J. S. Jr. (2012). p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head Neck Pathol**. 6 Suppl 1:S75-82.
- Li, Y., et al. (1994). Transcriptional repression of the D-type cyclin-dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. **Cancer Res**. 54(23):6078-82.
- Liang, C., et al. (2012). Biomarkers of HPV in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Cancer Res**. 72(19):5004-5013.
- Liu, S., et al. (2017). Nuclear survivin promoted by acetylation is associated with the aggressive phenotype of oral squamous cell carcinoma. **Cell Cycle**. 16(9):894-902.
- Licitra, L., et al. (2006). High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol**. 24(36):5630-6.
- Ling, X., et al. (2009). The proangiogenic factor stimulated by human papillomavirus type 16 E6 and E7 protein in C33A and human fibroblasts. **Oncol Rep**. 21(1):25-31.
- Lo Muzio, L., et al. (2001). Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. **Exp Mol Pathol**. 70(3):249–54.
- Lo Muzio, L., et al. (2003). Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. **Br J Cancer**. 89(12):2244-8.
- Lo Muzio, L., et al. (2004). HPV DNA and survivin expression in epithelial oral carcinogenesis: a relationship? **Oral Oncol**. 40(7):736-41.
- Lo Muzio, L., et al. (2005). Expression of cell cycle markers and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma: use of fuzzy neural networks. **Int J Cancer**. 115(5):717-23.
- Lopalco, P. L. (2016). Spotlight on the 9-valent HPV vaccine. **Drug Des Devel Ther**. 11:35-44.
- Lyford-Pike, S., et al. (2013). Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res**. 73(6):1733-41.

- Madani, A. H., et al. (2014). Interaction of alcohol use and specific types of smoking on the development of oral cancer. **Int J High Risk Behav Addict.** 3(1):e12120.
- Marcu, L. G. (2016). Future treatment directions for HPV-associated head and neck cancer based on radiobiological rationale and current clinical evidence. **Crit Rev Oncol Hematol.** 2016 Jul;103:27-36.
- Marioni, G. (2010). Survivin multifaceted activity in head and neck carcinoma: a: current evidence and future therapeutic challenges. **Acta Otolaryngol.** 130(1):4-9.
- Marklund, L., & Hammarstedt, L. (2011). Impact of HPV in Oropharyngeal cancer. **J Oncol.** 2011:509036.
- Mashberg, A., et al. (1993). Tobacco smoking, alcohol drinking, and cancer of the oral cavity and oropharynx among U.S. veterans. **Cancer.** 72(4):1369-75.
- McLaughlin-Drubin, M. E., et al. (2013). Tumor suppressor P16INK4A/INK4A is necessary for survival of cervical carcinoma cell lines. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 110(40):16175-80.
- Mehrotra, R. & Yadav, S. (2006). Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. **Indian J Cancer.** 43(2):60-6.
- Mendelsohn, A. H., et al., (2010). Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC. **Laryngoscope.** 120(9):1788-94.
- Ministério da Saúde (2016). Nota informativa 311, de 2016/CGPNI/DEVIT/SVS/MS. **Disponível (online)** <http://sbim.org.br/images/files/nota-informativa-311.pdf>. (25 de janeiro de 2017).
- Mirghani, H., et al. (2015a). Do high-risk human papillomaviruses cause oral cavity squamous cell carcinoma? **Oral Oncol.** 51(3):229-36.
- Mirghani, H., et al. (2015b). Treatment de-escalation in HPV-positive oropharyngeal carcinoma: Ongoing trials, critical issues and perspectives. **Int J Cancer.** 136(7):1494-503.
- Mirza, A., et al. (2002). Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. **Oncogene.** 21(17):2613-22.
- MITA, A. C., et al. (2008). Survivin: key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. **Clin Cancer Res.** 14(16):5000-5.
- Molijn, A. et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections. **Journal of Clinical Virology**, v. 32, p. 43-51, 2005.
- Mortier, L., et al. (2002). Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16(INK4a) tumor suppressor. **Cancer Lett.** 176(2):205-14.

Moura, E. C. & Malta, D. C. (2011). Consumo de bebidas alcoólicas na população adulta brasileira: características sociodemográficas e tendências. **Rev.Bras.Epidemiol.** 14(1) Supl.:61-70.

Nagel, R., et al. (2013). Treatment response of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma cell lines. **Oral Oncol.** 49(6):560-6.

Nakagawa, J. T. T., et al. (2010). Vírus HPV e câncer de colo do útero. **Revista Brasileira Enfermagem**, 63 (2):307-11.

National Cancer Institute (2014). **Disponível (online)**<<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>. (03 de janeiro de 2017).

Natunen, K., et al. (2011). Aspects of prophylactic vaccination against cervical Cancer and other human papillomavirus-related cancer sin developing countries. **Infect Dis Obstet Gynecol.** 1-10.

NCI (2016). Tumor Markers. **Disponível (online)**<http://www.cancer.gov>. (19 de dezembro de 2016).

Ndiaye, C., et al. (2014). HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. **Lancet Oncol.**15(12):1319-31.

Negi, A., et al. (2015). Comparison of Immunohistochemical Expression of Antiapoptotic Protein Survivin in Normal Oral Mucosa, Oral Leukoplakia, and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Patholog Res Int.** 2015:840739.

Nikitakis, N.G., et al. (2009). The oncogenic effects of constitutive Stat3 signaling in salivary gland cancer cells are mediated by survivin and modulated by the NSAID sulindac. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**107(6):826-36.

Obid (2017). Tipos de drogas: Tabaco. **Disponível (online)** <http://obid.senad.gov.br/obid>. (04 de janeiro de 2017).

Ock, C. Y., et al (2017). Changes in programmed death-ligand 1 expression during cisplatin treatment in patients with head and neck **squamous cell carcinoma**. *Oncotarget*.

Oguejiofor, K. K., et al. (2013). The prognostic significance of the biomarker p16 in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Clin Oncol (R Coll Radiol).** 25(11):630-8.

Ohta, S., et al. (2009). Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 107(1):81-91.

Okada, M. M. K., et al. (2000). Epidemiologia e Patogênese do Papilomavírus humano (HPV). In: I Consenso Brasileiro de HPV, 1. 2000. **Anais.** São Paulo: BG Editora. p. 01-06.

Oliveira, M. C., et al. (2002). Ação oncogênica do papilomavírus humano. **RBPO.** 1(1): 29-38.

- Oliveira, M. C., et al. (2003). HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. 69(4):553-559.
- O'regan, E. M. et al. (2006). Squamous cell carcinoma of the head and neck in young Irish adults. **Br J Oral Maxillofac Surg**. 44(3):203-6.
- Oriel, J. D. (1971). Natural history of genital warts. **Br J Venerol Dis**. 47 (1):1-13.
- Orosco, R. K., et al. (2016). Predictors of high-risk and low-risk oral HPV infection in the United States. **Laryngoscope**. 126(6):1365-1372.
- O'Sullivan, B., et al. (2012). Outcomes of HPV-related oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy alone using altered fractionation. **Radiother Oncol**. 103(1):49-56.
- Ovchinnikov, D. A., et al. (2014). DNA Methylation at the Novel CpG Sites in the Promoter of MED15/PCQAP Gene as a Biomarker for Head and Neck Cancers. **Biomarker Insights**. 9:53-60.
- Pajares, B., et al. (2014). Concurrent radiotherapy plus epidermal growth factor receptor inhibitors in patients with human papillomavirus-related head and neck cancer. **Clin Transl Oncol**. 16(4):418-24.
- Pannone G. et al. (2011). The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. **Infect Agent Cancer**. 6:4.
- Pannone, G., et al., (2012). Evaluation of a Combined Triple Method to Detect Causative HPV in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas: P16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. **Infect Agent Cancer**. 7: 4.
- Pardoll, D. M. (2012). The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nat Rev Cancer**. 12(4):252-64.
- Peggs KS., et al. (2008). Cell intrinsic mechanisms of T-cell inhibition and application to cancer therapy. **Immunol Rev**. 224:141-65.
- Perez-Ordoñez, B., et al. (2006). Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Pathol**. 59(5):445-53.
- Pérez-Sayáns, M., et al. (2011). p16INK4a/CDKN2 expression and its relationship with oral squamous cell carcinoma is our current knowledge enough? **Cancer Lett**. 306(2):134-41.
- Petti, S., et al. (2013). The magnitude of tobacco smoking-betel quid chewing-alcohol drinking interaction effect on oral cancer in South-East Asia. A metaanalysis of observational studies. **PLoS One**. 8(11): e78999.
- Poljak, M., (2012). Prophylactic human papillomavirus vaccination and primary prevention of cervical cancer: issues and challenges. **Clin Microbiol Infect**. 18 Suppl 5:64-9.
- Pollock, R. E., et al. (2006). **UICC Manual de Oncologia Clínica**. 8a ed. São Paulo: Fundação Oncocentro.

- Porcaro-Salles, J. M. (2007). **Câncer de Boca - Uma Visão Multidisciplinar**. Belo Horizonte.
- Porichis, F., et al. (2011). Responsiveness of HIV-specific CD4 T cells to PD-1 blockade. **Blood**.118(4):965-74.
- Preuss, S. F., et al. (2008). Nuclear survivin expression is associated with HPV-independent carcinogenesis and is an indicator of poor prognosis in oropharyngeal cancer. **Br J Cancer**. 98(3):627-32.
- Psyrrri, A. & DiMaio, D. (2008). Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. **Nat Clin Pract Oncol**.5(1):24-31.
- Pytynia, K. B., et al. (2014). Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**. 50(5):380-6.
- Quezada, S. A.& Peggs, K. S. (2013). Exploiting CTLA-4, PD-1 and PD-L1 to reactivate the host immune response against cancer. **Br J Cancer**. 108(8):1560-5.
- Quintero, K., et al. (2013). Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia. **Braz J Otorhinolaryngol**. 79(3):375–81.
- Rampias, T., et al. (2014). Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. **Oral Oncol**. 50(5):356-63.
- Ramqvist, T.& Dalianis, T. (2010). Oropharyngeal cancer epidemic and human papillomavirus. **Emerg Infect Dis**. 16(11):1671-7.
- Rautava, J.& Syrjanen, S. (2012). Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. **Head Neck Pathol**. 6 Suppl 1:S3-15.
- Remmele, W. & Schicketanz, K. H. (1993). Immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptor content in human breast cancer: Computer-assisted image analysis (QIC score) vs. subjective grading (IRS). **Pathol Res Pract**. 189(8): 862-6.
- Rettig, E. M. & D'Souza, G. (2015). Epidemiology of head and neck cancer. **Surg Oncol Clin N Am**. 24(3):379-96.
- Rettig, E., et al. (2015). The role of sexual behavior in head and neck cancer: implications for prevention and therapy. **Expert Rev Anticancer Ther**. 15(1):35-49.
- Ribeiro, A. C. P., et al. (2009). Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. **Br J Oral Maxillofac Surg**. 47(2):95-8.
- Rietbergen, M. M., et al. (2014). No evidence for active human papillomavirus (HPV) in fields surrounding HPV-positive oropharyngeal tumors. **J Oral Pathol Med**. 43(2):137-42.

Rintala, M. A. M., et al. (2005). Transmission of high-risk human papillomavirus (HPV) between parents and infant: a prospective study of HPV in families in Finland. **J Clin Microbiol.** 43(1):376-81.

Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. **Exp Cell Res.** 264(1):42-55.

Romana, P. G. (2010). Cell alterations and molecular mechanisms in oral carcinogenesis. **Int J Oral Maxillofac Surg.**

Roteli-Martins, C. M., et al. (2012). Sustained immunogenicity and efficacy of the HPV-16/18 AS04-adjuvanted vaccine: up to 8.4 years of follow-up. **Hum Vaccin Immunother.** 8(3):390-7.

Saiki, R. K., et al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science.** 239(4839):487-91.

Sarruf M.B.J.M. & Dias E.P. (1997). Avaliação citopatológica da cavidade bucal em pacientes portadores de infecção genital pelo papiloma vírus humano (HPV). **J Bras Doenças Sex Trans.** 9(2):4-18.

Saulle, R., et al. (2015). Human papillomavirus and cancerous diseases of the head and neck: a systematic review and meta-analysis. **Oral Diseases.** 21(4):417-31.

Scheffner, M., et al. (1990). The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. **Cell.** 63(6):1129-36.

Schiffman, M., (2010). A population-based prospective study of carcinogenic human papillomavirus variant lineages, viral persistence, and cervical neoplasia. **Cancer Res.** 70(8):3159-69.

Schlecht, N. F. et al. (2001). Effect of type of alcoholic beverage on the risks of upper aerodigestive tract cancers in Brazil. **Cancer Causes Control.** 12(7):579-87.

Schreiber, R. D. (2005). Cancer vaccines 2004 opening address: the molecular and cellular basis of cancer immunosurveillance and immunoediting. **Cancer Immun.** 5 Suppl 1:1.

Secretan, B., et al (2009). A Review of Human carcinogens-Part E:Tobacco, Areca Nut, Alcohol, Coal Smoke, and Salted Fish. **Lancet Oncol.** 10(11):1033-4.

Serrano, M., et al. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature.** 366(6456):704-7.

Serrano, M., et al. (1993). A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. **Nature.** 366(6456):704-7.

Shi, W., et al. (2009). Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. **J Clin Oncol.** 27(36):6213-21.

- Sichero, L., et al. (2007). High grade cervical lesions are caused preferentially by non-European variants of HPVs 16 and 18. **Int J Cancer**. 120(8):1763-8.
- Simonato, L. E. & Miyahara, G. I. (2007). O Papel do Papilomavírus Humano na Carcinogênese Bucal. **Revista Brasileira de Cancerologia**. 53(17):471–476.
- Singh, B. (2008). Molecular pathogenesis of head and neck cancers. **J Surg Oncol** 15;97(8):634-9.
- Slebos, R. J. C., et al. (2006). Gene Expression Differences Associated with Human Papillomavirus Status in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Clin Cancer Res**. 12(3 Pt 1):701-9.
- Smyth, M.J., et al. (2004). Cytokines in cancer immunity and immunotherapy. **Immunological Rev**. 202: 275-293.
- Snijders, P.J.F., et al. (2010). Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. **APMIS**. 118(6-7):520-8.
- Soares, R. C., et al. (2007). Human papillomavirus in oral squamous cells carcinoma in a population of 75 Brazilian patients. **American journal of otolaryngology**. 28(6):397-400.
- Sommer, K.W., et al. (2003). Inhibitor of apoptosis protein (IAP) survivin is upregulated by oncogenic c-H-Ras. **Oncogene**. 22(27):4266-80.
- Soni, S., et al. (2005). Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. **Oncology**. 68(4-6):314-25.
- Sotlar, K., et al., (2004). Detection and typing of human papillomavirus by E6 nested multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. 42(7): 3175-3184.
- Souho, T., et al. (2015). Human papillomavirus infection and fertility alteration: a systematic review. **PLoS One**. 10(5):e0126936.
- Sousa, F. A. C. G. D., et al. (2009). Estudo comparativo das alterações celulares no líquen plano e no carcinoma epidermóide bucal. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. 75(2):245–248.
- Sousa, H., et al. (2007). Is the p53 codon 72 polymorphism a key biomarker for cervical cancer development? A meta-analysis review within European populations. **Int J Mol Med**. 20(5):731-41.
- Spíndula-Filho, J. V., et al. (2011). Oral squamous cell carcinoma versus oral verrucous carcinoma: an approach to cellular proliferation and negative relation to human papillomavirus (HPV). **Tumour Biol**. 32(2):409-16.
- Srinivas, P. R., et al. (2001). Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncol**. 2(11): 698-704.

- St Guily, J. L., et al. (2011). Human papillomavirus genotype distribution in tonsil cancers. **Head Neck Oncol.** 3(1):6.
- Stanley, M. A. (2009). Immune responses to human papilloma viruses. **Indian J Med Res.** 130(3):266-76.
- Stoppler, H., et al. (1997). The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins dissociate cellular telomerase activity from the maintenance of telomere length. **J Biol Chem.** 272(20):13332-7.
- Stöppler, M.C., et al. (1996). The E5 gene of HPV-16 enhances keratinocyte immortalization by full-length DNA. **Virology.** 223(1):251-4.
- Straight, S. W., et al. (1995). The E5 oncoprotein of human papillomavirus type 16 inhibits the acidification of endosomes in human keratinocytes. **J Virol.** 69(5):3185-92.
- Strome, S. E., et al. (2003). B7-H1 blockade augments adoptive T-cell immunotherapy for squamous cell carcinoma. **Cancer Res.**63(19):6501-5.
- Sudhoff, H. H., et al. (2011). Evidence for a causal association for HPV in head and neck cancers. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 268(11):1541-7.
- Syrjanen, K. J., et al. (1983). Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. **Br. J. Oral Surg.**21(2):147-53.
- Syrjanen, S. (2010). The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. **Ann Oncol.** 21 Suppl 7:vii243-5.
- Syrjänen, S., et al. (2011). Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. **Oral Dis.** 17 Suppl 1:58-72.
- Sznol, M. & Chen, L. (2013). Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer. **Clin Cancer Res.**19(19):5542.
- Taube, J. M., et al., (2012). Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. **Sci Transl Med.** 4(127):127ra37.
- Termine, N., et al. (2008). HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007). **Ann oncol.** 19(10):1681-90.
- Thavaraj, S., et al. (2011). Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. **J Clin Pathol.** 64(4):308-12.
- Thavaraj, S., et al. (2014). Patients with HPV-related tonsil squamous cell carcinoma rarely harbor oncogenic HPV infection at other pharyngeal sites. **Oral Oncol.** 50(4):241-6.
- The FUTURE II Study Group (2007). Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical cancer. **The New England Journal of Medicine.** 356 (19):1915-27.

- Todd, R., et al. (2002). Cell cycle dysregulation in oral cancer. **Crit Rev Oral Biol Med.** 13(1):51-61.
- Torre, L. A., et al. (2015). Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin.** 65(2):87-108.
- Tribius, S., et al. (2012). HPV status in patients with head and neck of carcinoma of unknown primary site: HPV, tobacco smoking, and outcome. **Oral Oncol.** 48(11):1178-84.
- Ukpo, O. C., et al. (2013). B7-H1 expression model for immune evasion in human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head Neck Pathol.**7(2):113-21.
- van Monsjou, H. S., et al. (2010). Oropharyngeal squamous cell carcinoma: a unique disease on the rise? **Oral Oncol.** 46(11):780-5.
- Vargas, D., et al. (2009). Prevalência de dependência alcoólica em serviços de atenção primária a saúde de Bebedouro, São Paulo. **Cad. Saúde Pública.** 25(8):1711-1720.
- Vasconcelos, L., et al. (2014). Invasive head and neck cutaneous squamous cell carcinoma: clinical and histopathological characteristics, frequency of local recurrence and metastasis. **An Bras Dermatol.** 89(4):562-8.
- Veldman, T., et al. (2001). Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. **J Virol.**75(9):4467-72.
- Vietía, D., et al. (2014). Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinoma. **Ecancermedicalsecience.** 8:475.
- Wang, Z., et al. (2004). Survivin regulates the p53 tumor suppressor gene family. **Oncogene.** 23(49):8146-53.
- Ward, M. J. et al. (2014). Staging and treatment of oropharyngeal cancer in the human papillomavirus era. **Head Neck.** 37(7):1002-13.
- Westra, W. H. (2009). The Changing Face of Head and Neck Cancer in the 21st Century : The Impact of HPV on the Epidemiology and Pathology of Oral Cancer. **Head and Neck Pathol.** 3(1):78-81.
- Who (2017). Cancer fact sheet 297. **Disponível (online)** www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html (03 janeiro de 2017).
- Wittekindt, C., et al. (2012). Basics of tumor development and importance of human papillomavirus (HPV) for head and neck cancer. **GMS Curr Top Otorhinolaryngol** **Head Neck Surg.** 11:Doc09.
- Wong, D. T. & Münger K. (2000). Association of human papillomaviruses with a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. **J Natl Cancer Inst.** 92(9):675-7.

Woodman, C. B., et al. (2007). The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nat Rev Cancer**. 7(1):11-22.

XIA, C., et al. (2002). Induction of Apoptosis in Mesothelioma Cells by Antisurvivin Oligonucleotides. **Mol Cancer Ther**. 1(9):687-94.

Yang, J. Q., et al. (2016). Correlation of HPV16 infection and p16 expression with prognosis in patients with hypopharyngeal carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol** 9(5):4978-4985.

Yom, S. S., et al. (2016). What's new in head and neck cancer: key findings in 2015-2016 from ECCO/ESMO, ASTRO, and the multidisciplinary head and neck cancer symposium. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**. 35:176-83.

Yuen, P. W., et al. (2002). Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. **J Clin Pathol**. 55(1):58-60.

Zaitune, M. P. A., et al. (2012). Factors associated with smoking in the elderly: a health survey in São Paulo (ISA-SP). **Cad Saude Publica**. 28(3):583-96.

Zandberg, D. P. & Strome S. E. (2014). The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncol**. 50(7):627-632.

Zaravinos, A. (2014). An updated overview of HPV-associated head and neck carcinomas. **Oncotarget**.5(12):3956-69.

Zatonski, T., et al. (2016). Expression of Cell Cycle-Related Proteins p16, p27, p53 and Ki-67 in HPV-positive and -negative S amples of Papillomas of the Upper Respiratory Tract. **Anticancer Res**. 36(8):3917-24.

Zhang, B., et al. (2003). The E5 protein of human papillomavirus type 16 perturbs MHC class II antigen maturation in human foreskin keratinocytes treated with interferon-gamma. **Virology**. 310(1):100-8.

Zhang, F., et al. (2008). The clinical significance of the expression of costimulatory molecule PD-L1 in nasopharyngeal carcinoma. **Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi**.22(9):408-10.

Zhang, L., et al. (2015). Dual induction of apoptotic and autiphagic cell death by targeting survivin in head neck squamous cell carcinoma. **Cell Death Dis**. 6:e1771.

Zhu, X.,et al. (2016). The role of human papillomavirus in head and neck cancer and the impact on radiotherapy outcome. **Acta Otolaryngol**. 136(12):1291-1298.

Zitvogel, L.&Kroemer, G. (2012). Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. **OncImmunity**. 1(8):1223-1225.

Zitvogel, L., et al. (2006). Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. **Nature Rev Immunol**.6(10):715-27.

zur Hausen, H. (1977). Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. **Curr Top Microbiol Immunol.** 78:1-30.

Zushi, Y., et al. (2011). An in vitro multistep carcinogenesis model for both HPV-positive and -negative human oral squamous cell carcinomas. **Am J Cancer Res.**1(7):869-81.

ANEXO 1

UNIVERSIDADE DE CAXIAS
DO SUL-RS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE SURVIVINA E TUBULINA E SUA RELAÇÃO COM O PAPILOMAVÍRUS HUMANO EM CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTUDO RETROSPECTIVO

Pesquisador: Alessandra Eifler Guerra Godoy

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 47152015.5.0000.5341

Instituição Proponente: Fundação Universidade de Caxias do Sul - FUCS/RS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.485.122

Apresentação do Projeto:

Ver parecer 1.326.874

Objetivo da Pesquisa:

Ver parecer 1.326.874

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ver Conclusões

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Ver parecer 1.326.874

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver parecer 1.326.874

Recomendações:

Ver Conclusões

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendência 1: Atendida

Pendência 2: Atendida. Entretanto, insistimos que o tamanho amostral não está relacionado a frequência da doença, mas às premissas do pesquisador e no comportamento das variáveis. No

Endereço: FRANCISCO GETULIO VARGAS

Bairro: PETROPOLIS

CEP: 95.070-560

UF: RS

Município: CAXIAS DO SUL

Telefone: (54)3218-2829

Fax: (54)3218-2100

E-mail: cep-ucs@ucs.br

UNIVERSIDADE DE CAXIAS
DO SUL-RS



Continuação do Parecer: 1.485.122

caso, identificação de biomarcadores na presença e na ausência de biomarcadores. Esta amostra de conveniência serve como um estudo piloto, ou simplesmente a mostrar a experiência do grupo.

Pendência 3. Atendida

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_545148.pdf	21/02/2016 17:48:02		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	RecursoCEPTubulina2.doc	21/02/2016 17:47:26	Alessandra Eifler Guerra Godoy	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto2Tubulina2015.doc	21/02/2016 17:46:21	Alessandra Eifler Guerra Godoy	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoTubulina.pdf	06/10/2015 21:41:12	Alessandra Eifler Guerra Godoy	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	coeditubulina.pdf	06/10/2015 21:35:45	Alessandra Eifler Guerra Godoy	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMOdeCONFIDENCIALIDADEtubulina.doc	05/10/2015 22:38:27	Alessandra Eifler Guerra Godoy	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAXIAS DO SUL, 24 de Março de 2016

Assinado por:
Luciane Andreia Bizzi
(Coordenador)

Endereço: FRANCISCO GETULIO VARGAS
Bairro: PETROPOLIS CEP: 95.070-560
UF: RS Município: CAXIAS DO SUL
Telefone: (54)3218-2829 Fax: (54)3218-2100 E-mail: cep-ucs@ucs.br

ANEXO 2



EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES EM CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTUDO PILOTO.

R. GIACOMINI^{1*}, A. E. G. GODOY², I. E. LITVIN³, F. F. PASQUALOTTO⁴

¹ Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia. Pinheiro Machado 2569. Rio Branco, 95020172 - Caxias do Sul, RS - Brasil

² Universidade de Caxias do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Patologia. Francisco Getulio Vargas, 1130. Universitário, 95020-972 - Caxias do Sul, RS - Brasil

³ Universidade de Caxias do Sul, Centro de Ciências da Saúde. Rua Francisco Getúlio Vargas. Petrópolis, 95070560 - Caxias do Sul, RS - Brasil

⁴ Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Laboratório do Estresse Oxidativo. Pinheiro Machado 2569 sls 23/24. Rio Branco, 95020172 - Caxias do Sul, RS - Brasil

*Apresentador: rosanegiacomini@gmail.com

RESUMO: O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum, com estimada incidência anual, de um milhão de casos em todo o mundo, sendo considerado um problema global de saúde pública. O tabaco e o álcool são os principais fatores etiológicos, mas nas últimas décadas a infecção pelo HPV tem sido associada à doença. Os biomarcadores podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes com câncer, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. O gene *p53* é um supressor tumoral, comumente mutado em neoplasias humanas, sendo identificado aumento da sua expressão em neoplasias malignas. A expressão de tubulina está relacionada com a resistência a fármacos que tem como alvo a tubulina e os microtúbulos. A superexpressão do receptor do fator de crescimento epidermico (EGFR) é um fator de prognóstico negativo, associado com pior controle local e sobrevida do paciente. *p63*, homólogo de *p53*, é um marcador de diferenciação escamosa, sendo observado uma relação inversamente proporcional entre a expressão de *p63* e sobrevida em carcinoma oral. A superexpressão de *p16* pode ser considerada um marcador de prognóstico favorável, afetando o comportamento clínico dos tumores. O objetivo deste trabalho foi identificar, por imunohistoquímica, os níveis de expressionais de *p53*, tubulina, EGFR, *p63* e *p16* em amostras de lesões malignas de cabeça e pescoço. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da UCS através do CAAE: 47152015.5.0000.5341. Foram utilizadas sete amostras teciduais, obtidas por biópsia de lesões de cabeça e pescoço, de pacientes submetidos a tratamento para câncer, atendidos no Serviço de Oncologia Do Hospital Geral de Caxias do Sul. As amostras foram selecionadas retrospectivamente, tendo como critério de seleção a presença de carcinoma de cabeça e pescoço. Avaliou-se a expressão proteica por imunohistoquímica. A análise foi realizada em microscópio óptico, por dois médicos patologistas treinados, independentemente, através da utilização do escore H. Com exceção do *p63*, que não apresentou alteração na sua expressão, os demais marcadores apresentaram alterações que variam, da ausência de expressão a

expressão elevada, indicando que a obtenção de um maior número de informações sobre a expressão dos biomarcadores pode auxiliar na decisão terapêutica.

PALAVRAS-CHAVE: câncer; cabeça e pescoço; biomarcadores.

ANEXO 3

DOI 10.22533/at.ed.3182806

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DE BIOMARCADORES EM CARCINOMAS DE CABEÇA E PESCOÇO: ESTUDO PILOTO

Rosane Giacomini

Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia

Caxias do Sul - RS

Alessandra Eifler Guerra Godoy

Universidade de Caxias do Sul, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,

Departamento de Patologia

Caxias do Sul - RS

Isnard Elman Litvin

Universidade de Caxias do Sul, Centro de Ciências da Saúde

Caxias do Sul – RS

Fabio Firmbach Pasqualotto

Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidante

Caxias do Sul - RS

RESUMO: O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer mais comum, com estimada incidência anual, de um milhão de casos em todo o mundo, sendo considerado um problema global de saúde pública. O tabaco e o álcool são os principais fatores etiológicos, mas nas últimas décadas a infecção pelo HPV tem sido associada à doença. Os biomarcadores podem ser úteis no manejo clínico dos pacientes com câncer, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas. O objetivo deste trabalho foi identificar, por imunohistoquímica, os níveis expressionais dos biomarcadores p53, tubulina, EGFR, p63 e p16 em amostras de lesões malignas de cabeça e pescoço. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética em pesquisa da UCS através do CAAE: 47152015.5.0000.5341. Foram utilizadas sete amostras teciduais, obtidas por biópsia de lesões de cabeça e pescoço, de pacientes submetidos a tratamento para câncer, atendidos no Serviço de Oncologia Do Hospital Geral de Caxias do Sul. As amostras foram selecionadas retrospectivamente, tendo como critério de seleção a presença de carcinoma de cabeça e pescoço. Avaliou-se a expressão proteica por imunohistoquímica. A análise foi realizada em microscópio óptico, por dois médicos patologistas treinados, independentemente, através da utilização do escore H. Com exceção do p63, que não apresentou alteração na sua expressão, os demais marcadores apresentaram alterações que variam, da ausência de expressão a expressão elevada, indicando que a obtenção de um maior número de informações sobre a expressão dos biomarcadores pode auxiliar na decisão terapêutica.

PALAVRAS-CHAVE: HPV, cabeça e pescoço, câncer.

1. INTRODUÇÃO

Durante muitos séculos o câncer foi uma doença própria dos países desenvolvidos. No entanto, nas últimas décadas ela vem se alastrando por todo o mundo, atingindo de forma avassaladora tanto as grandes potências quanto os países em desenvolvimento. Por este motivo, ele tem-se apresentado como um relevante problema de saúde pública a nível mundial (1).

O conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem os tecidos e órgãos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo é chamado de câncer, neoplasia ou tumor maligno (3, 4).

O processo de carcinogênese acontece quando as células deixam de seguir o processo natural de divisão, amadurecimento e morte, do ciclo celular e passam a sofrer mutação em um ou mais genes, sendo induzidas ao desenvolvimento desordenado, produzindo novas células anormais, que se agrupam umas sobre as outras e, por fim, formam uma massa de tecido chamada tumor. Dependendo das características das células envolvidas, é um processo que pode ser rápido ou levar anos. A gravidade e a extensão do tumor encontrar-se diretamente relacionadas ao prognóstico da doença (5).

A expressão câncer de cabeça e pescoço define um grupo heterogêneo de neoplasias malignas, que compartilham fatores de risco comuns, e apresentam semelhanças em sua epidemiologia, tratamento e prognóstico. Essas neoplasias estão localizadas no trato aerodigestivo superior, ou seja, que acometem a cavidade bucal que incluem lábio, a base da língua, a língua, gengiva, boca e palato, a faringe que envolve a orofaringe, hipofaringe e nasofaringe e a laringe (6).

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECCP) corresponde a 20% dos tumores epiteliais malignos que acometem caucasianos (7), ocorrendo mais frequentemente entre a quinta e a sétima décadas de vida. No Brasil, há um risco estimado de 10 novos casos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (3).

A taxa de sobrevivência referente ao CECCP, em um período de 5 anos, é de 50% e o tratamento é baseado em radioterapia, em combinação com cirurgia e/ou fármacos citostáticos. Entretanto, a recidiva, bem como a resistência a esses tratamentos são frequentes nesse carcinoma (8, 9).

A sobrevivência média dos pacientes em estádios avançados da doença não tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, apesar dos avanços das técnicas cirúrgicas e de novas abordagens terapêuticas.

Os CECCP são distintos quanto ao padrão de crescimento, comportamento clínico e prognóstico, embora considerados como uma única entidade histopatológica. Tumores de orofaringe têm maior tendência a gerar metástases, em contraste com os carcinomas de cavidade oral e da laringe. Além disso, tumores de cavidade oral, geralmente, são mais diferenciados do que os carcinomas de orofaringe. Em particular, os tumores de hipofaringe são geralmente mais agressivos do que os tumores localizados em outros sítios anatômicos de cabeça e pescoço (10).

Essa neoplasia ocorre, principalmente, no sudeste da Ásia, nas regiões centrais e no sudoeste da Europa, especialmente na Espanha e na França, e no Brasil. A América do Norte e o norte da Europa ocupam uma posição intermediária na distribuição geográfica desse carcinoma; já o Japão, a China e o oeste Africano apresentam proporções baixas de distribuição da doença (11).

Segundo a World Health Organization (WHO), o câncer é uma das principais causas de mortes no mundo. As projeções são de que estes números continuem crescendo (4).

A estimativa para o Brasil, biênio 2016-2017, aponta a ocorrência de cerca de 600 mil novos casos (15). Sendo que o aumento do número de novas ocorrências resultado crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e das mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento(14).

O CECCP é o sexto tipo de câncer de maior incidência mundial (12), sendo a oitava causa de morte por câncer no mundo (13). Esse tipo de câncer pode afetar diferentes áreas anatômicas. Em média, 40% dos casos ocorrem na cavidade oral, 25% na laringe, 15% na faringe, 7% nas glândulas salivares e 13% nos locais restantes (14).

Mais de 600.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados, a cada ano, em todo o mundo, representando 5% de todos os tumores malignos. Sendo que, a maioria destes, é diagnosticada em estágio clínico avançado da doença (60% estágio III e IV). O carcinoma de células escamosas ou epidermoide é o tipo histológico predominante (16, 17).

Devido à natureza multigênica da doença e aos fatores individuais de suscetibilidade genética, estilo de vida e ao grande número de agentes ambientais potenciais aos quais os indivíduos estão expostos, a epidemiologia dos carcinomas de cabeça e pescoço é extremamente complexa. Sendo que, a diversidade de fatores relacionados com a gênese do CECCP apóia a hipótese de doença multifatorial (18).

O desenvolvimento do CECCP é um processo que ainda não está completamente entendido, entretanto existem evidências que sugerem o papel de vários fatores associados, individualmente ou em conjunto, a um risco aumentado da ocorrência deste tipo de câncer (20).

A exposição a determinados agentes químicos, físicos ou biológicos em um paciente geneticamente propenso, ao promover mutações genéticas, desencadearão o desenvolvimento do tumor maligno (22).

Os principais fatores de risco para os tumores de cabeça e pescoço são o tabagismo e o etilismo, porém deve-se ainda considerar outros fatores relacionados aos hábitos de vida, à ocupação e à classe social (23). Além desses fatores, a infecção viral pelo papilomavírus humano (HPV), que está relacionada a comportamentos sexuais, tem sido considerada um fator de risco para o desenvolvimento desse tipo de tumor (24).

Cada fator de risco aumenta em duas a três vezes o risco de se desenvolver câncer isoladamente, mas quando combinados, esse risco aumenta em cerca de quinze vezes (20).

Definir o prognóstico e o risco de desenvolvimento, assim como o sucesso do tratamento em resposta a uma determinada medicação e/ou procedimento, constituem a principal razão para a identificação de marcadores biológicos ou biomarcadores (27).

A expressão de biomarcadores pode refletir diversos processos em andamento nas células tumorais (21). O gene *p53* é um supressor tumoral, comumente mutado em neoplasias humanas, sendo identificado aumento da sua expressão em neoplasias malignas. A expressão de tubulina está relacionada com a resistência a fármacos que tem como alvo a tubulina e os microtúbulos (19, 26). A superexpressão do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um fator

de prognóstico negativo, associado com pior controle local e sobrevida do paciente (21). *p63*, homólogo de *p53*, é um marcador de diferenciação escamosa, sendo observada uma relação inversamente proporcional entre a expressão de *p63* e sobrevida em carcinoma oral (25). A superexpressão de *p16* pode ser considerada um marcador de prognóstico favorável, afetando o comportamento clínico dos tumores (2).

O objetivo deste trabalho foi identificar, por imunohistoquímica, os níveis de expressão de *p53*, tubulina, EGFR, *p63* e *p16* em amostras de lesões malignas de cabeça e pescoço. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UCS através do CAAE: 47152015.5.0000.5341.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas sete amostras teciduais, armazenadas em blocos de parafina, obtidas por biópsia de lesões de cabeça e pescoço, de pacientes submetidos a tratamento para câncer, atendidos no Serviço de Oncologia Do Hospital Geral de Caxias do Sul. As amostras foram selecionadas retrospectivamente, tendo como critério de seleção a presença de carcinoma de cabeça e pescoço. No material histopatológico (blocos de parafina com amostras de câncer de cabeça e pescoço) foi realizado exame imunohistoquímico para detecção dos níveis de expressão de *p53*, tubulina, EGFR, *p63* e *p16*. Foram feitos cortes histológicos com 4 micra de espessura montados em lâminas de vidro salinizadas. Os procedimentos de imunohistoquímica foram realizados de acordo com as instruções do fabricante do anticorpo. A análise foi realizada em microscópio óptico, por dois médicos patologistas treinados, independentemente, através da utilização de graus de intensidade de expressão proteica, sendo 0: negativo, 1+: fraca, 2+: moderado e 3+: forte.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras teciduais avaliadas (Figura 1) pertencem a indivíduos do sexo masculino com idade mediana igual a 61. Com exceção do *p63*, que não apresentou alteração na sua expressão, *p53*, tubulina, EGFR e *p16* apresentaram alterações, que variam da ausência de expressão a expressão elevada (Figura 2). Estudos mostram que a superexpressão de *p63*, *p53*, tubulina e EGFR são indicativos de pior prognóstico (19, 21, 25, 26) e a superexpressão de *p16* indica melhor prognóstico (2). A diferente expressão destas proteínas pode estar associada com a resposta ao tratamento, indicando que estes biomarcadores poderiam ser utilizados para projetar estratégias de tratamento individuais.

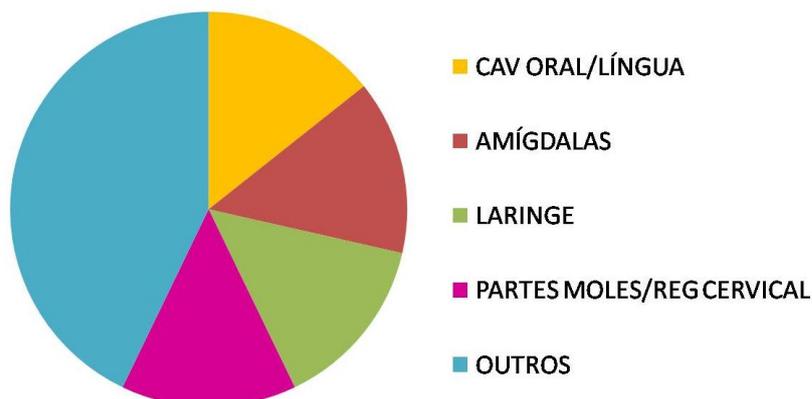


Figura 1: Distribuição das amostras teciduais, por sítios anatômicos.

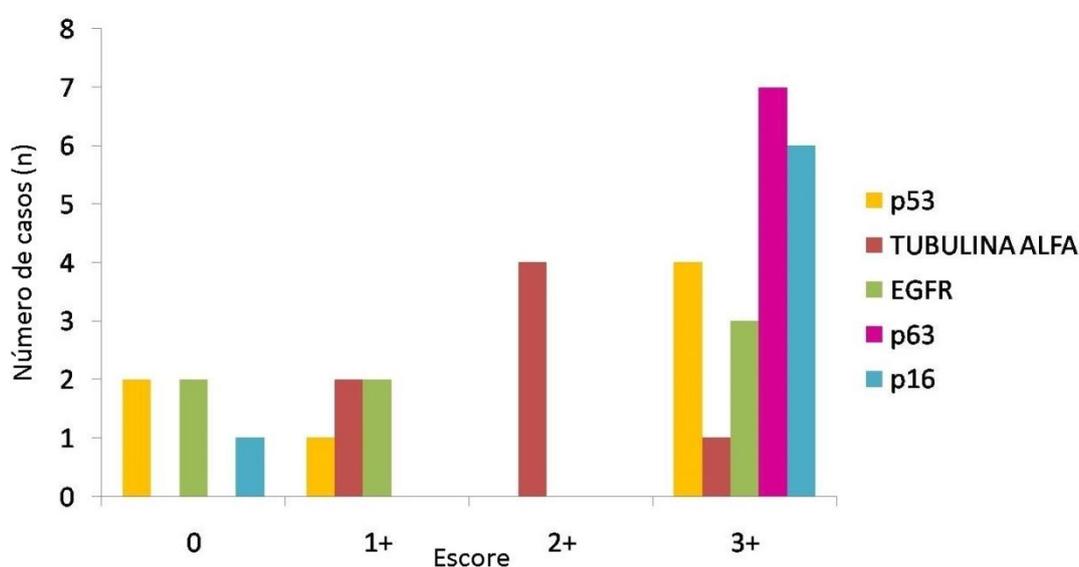


Figura 2: Níveis de expressão de p53, tubulina, EGFR, p63 e p16.

4. CONCLUSÃO

A obtenção de um maior número de casos e de informações sobre a expressão dos biomarcadores p53, tubulina, EGFR, p63 e p16 pode auxiliar na decisão terapêutica, podendo ser útil no manejo clínico dos pacientes, além de auxiliar no desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALVARES, J. B.; VICENTE, L. C. C. A fonoaudiologia na radioterapia. In: Porcaro-Salles JM, Freire ARS, Vicente LCC. (Org.). **Câncer de boca: uma visão multidisciplinar**. 1ed. Belo Horizonte: Coopmed, 1: 213-217, 2007.
2. EL-NAGGAR, A. K. L.; WESTRA W. H. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: A guide for interpretative relevance and consistency. **Head Neck**, 34(4):459-61,2012.

3. FARIDI, R. et al. Oncogenic potencial of Human Papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. **Virologia J.**, 8:269, 2011.
4. FARNEBO, L. et al. STRONG expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Int. J. Cancer**, 133(8):1994-2003, 2013.
5. FELLER, L. et al. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. **Infect Agent Cancer**, 25;4:16, 2009.
6. FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C.C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. 664p.
7. FREITAS, D. A. et al. Sequelas bucais da radioterapia de cabeça e pescoço. **Revista CEFAC**, 13(6):1103-1108, 2011.
8. FUNG, C.; GRANDIS, J.R. Emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. **Expert Opin Emerg Drugs**, 15(3):355-73, 2010.
9. GARLAND, S. M. Human papillomavirus update with a particular focus on cervical disease. **Pathology**, 34(3):213-24, 2002.
10. HAN, S. et al. Epidemiology and cost analysis for patients with oral cancer in a university hospital in China. **BMC Public Health**, 10:196, 2010.
11. HECK, J. E. et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. **Int J Epidemiol**, 39(1):166-81, 2010.
12. HERCHENHORN, D.; DIAS, F. L. Advances in radiochemotherapy in the treatment of head and neck cancer. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ.**, 59(1):39-46, 2004.
13. HSU, H. W. et al. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers. **Oral Oncology**, 50(1):19-26, 2014.
14. INCA. Estimativa 2014: **Incidência de Câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2014.
15. INCA. Estimativa 2016: **Incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2015.
16. JEON, S.; LAMBERT, P.F. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: Implications for cervical carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 92(5):1654-8, 1995.

17. JORDAN, R. C. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. **Am J Surg Pathol.**, 36(7):945–54, 2012.
18. KATANODA, K.; YAKO-SUKETOMO, H. Cancer mortality attributable to tobacco by selected countries based on the WHO Global Report. **Jpn J Clin Oncol.**, 42(9):866, 2012.
19. KIM, M-J. et al. Different protein expression associated with chemotherapy response in oropharyngeal cancer according to HPV status. **BMC Cancer**, 14:824, 2014.
20. KREIMER, A. R. Et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **CâncerEpidemiol Biomarkers Prev.**, 14(2):467-75, 2005.
21. LANGER, C. J. Exploring biomarkers in head and neck cancer. **Cancer**, 118(16):3882-92, 2012.
22. LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**, 11(1):9-22, 2011.
23. LEITZMANN, M. F. et al. Physical activity and head and neck cancer risk. **Cancer Causes and Control**, 19(10):1391-9, 2008.
24. LICITRA, L. et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, 24(36) 5630-36, 2006.
25. LO MUZIO, L. p63 overexpression associates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. **Hum Pathol.**, 36(2):187-94, 2005.
26. LOBERT, S. et al. Prognostic biomarkers for HNSCC using quantitative real-time PCR and microarray analysis: β -tubulin isotypes and the p53 interactome. **Cytoskeleton (Hoboken)**, 71(11):628-37, 2014.
27. SRINIVAS, P. R. et al. Trends in biomarker research for cancer detection. **Lancet Oncol.**, 2(11): 698-704, 2001.

ABSTRACT: Head and neck epidermoid carcinoma is the sixth most common type of cancer, with an estimated annual incidence of one million cases worldwide, and is considered a global public health problem. Tobacco and alcohol are the major etiological factors, but in the last decades HPV infection has been associated with the disease. Biomarkers can be useful in the clinical management of cancer patients, as well as helping to develop new therapeutic modalities. The objective of this work was to identify, by immunohistochemistry, the expression levels of the biomarkers p53, tubulin, EGFR, p63 and p16 in samples of malignant head and neck lesions. The study was approved by the UCS Research Ethics Committee through CAAE: 47152015.5.0000.5341. Seven tissue samples obtained by biopsy of head and neck

lesions of patients submitted to cancer treatment were used at the Oncology Service of the General Hospital of Caxias do Sul. The samples were selected retrospectively, having as selection criteria the presence of head and neck carcinoma. Protein expression was assessed by immunohistochemistry. The analysis was performed under optical microscope by two trained pathologists independently using the H score. With the exception of p63, which did not show alteration in its expression, the other markers presented alterations ranging from absence of expression to expression elevated, indicating that obtaining a greater number of information on the expression of the biomarkers may aid in the therapeutic decision.

KEY WORDS: HPV, head and neck, cancer.