

**UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO HPV NA EXPRESSÃO DE MIR-145  
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL**

**TESE**

**MARIANA GOUVÊA FERNANDES RODRIGUES**

**2023**

UNIVERSIDADE DO GRANDE RIO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO HPV NA EXPRESSÃO DE MIR-145  
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

MARIANA GOUVÊA FERNANDES RODRIGUES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO/AFYA), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Área de concentração: Implantodontia).

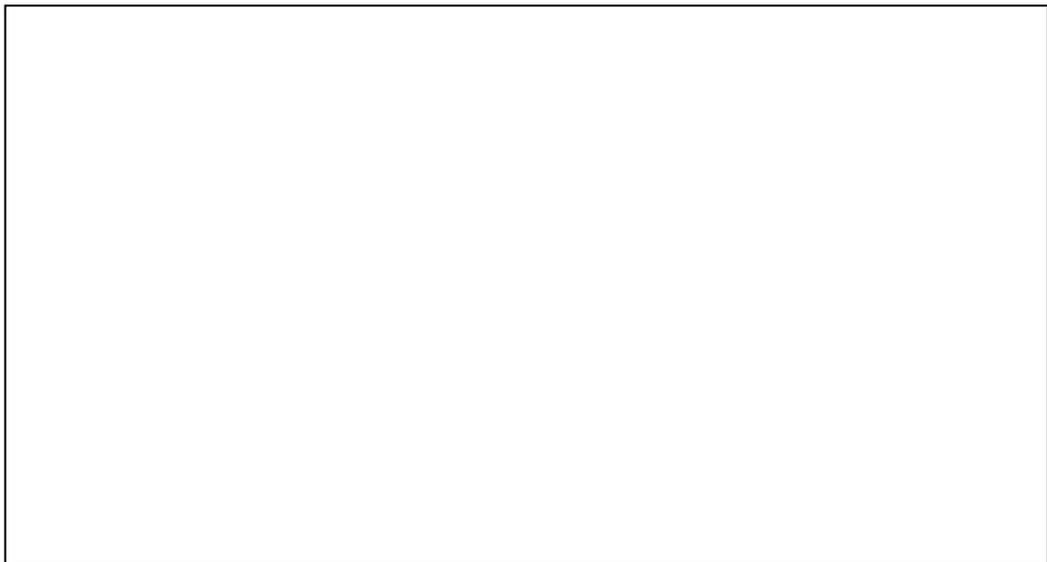
Orientadoras

Profa. Dra. Claudia Maria Pereira

Profa. Dra. Danielle Dutra Voigt

Profa. Dra. Sara Gemini Piperni

**CATALOGAÇÃO NA FONTE UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE  
BIBLIOTECAS**



AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO HPV NA EXPRESSÃO DE MIR-145  
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

MARIANA GOUVÊA FERNANDES RODRIGUES

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO/AFYA), como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Odontologia (Área de concentração: Implantodontia).

Aprovada em     de             de 2023.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Universidade do Grande Rio

---

Prof. Dr<sup>a</sup>

Universidade do Grande Rio

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Suelen Cristina Sartoretto

Universidade Veiga de Almeida

## DEDICATÓRIA

Dedico este projeto a todos os professores que me influenciaram na minha trajetória. Em especial minhas orientadoras, com quem compartilhei minhas dúvidas e angústias a respeito do tema. A dedicação e paciência serviram como pilares de sustentação para a conclusão deste trabalho. Assim como também à toda minha família. Sua grande força foi a mola propulsora que permitiu o meu avanço, mesmo durante os momentos mais difíceis.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro de tudo, gostaria de agradecer à Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Agradeço a ele também por manter minha família ao meu lado, com saúde apesar das circunstâncias. Agradeço aos meus pais e avó, que sempre me motivaram, entenderam as minhas faltas e momentos de afastamento e reclusão e me mostraram o quanto era importante estudar, mesmo não tendo eles a mesma oportunidade no passado.

Agradeço as minhas coordenadoras Cláudia, Danielle e Sara que com excelência conduziram maravilhosamente este estudo até aqui. Ainda, quanto aos professores, agradeço a todos eles do PPGO, pelos ensinamentos que passaram, os quais foram, são e serão muito importantes para mim e para a minha vida profissional, assim como agradeço aos funcionários, que fazem com que tudo funcione da melhor maneira possível.

Agradeço a chance e honra de participar deste programa de mestrado sendo bolsista e foi uma grande emoção inacreditável ao ver que tinha sido aprovada.

Obrigada.

## EPIGRAFE

“Deixem que o futuro diga a verdade e avalie cada um de acordo com o seu trabalho e realizações. O presente pertence a eles, mas o futuro pelo qual eu sempre trabalhei pertence a mim”

Nikola Tesla.

## ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	13
1.1.	Revisão de Literatura.....	15
1.1.1.	O Câncer Oral.....	15
1.1.1.1	<i>Epidemiologia</i> .....	15
1.1.1.2	<i>Etiopatogenia</i> .....	19
1.1.1.3	<i>Aspectos Clínicos</i> .....	21
1.1.1.4	<i>Diagnóstico e Tratamento</i> .....	22
1.1.1.5	Aspectos histopatológicos.....	22
1.1.1.6	<i>Prognóstico</i> .....	24
1.1.2.	O Papiloma Vírus Humano (HPV).....	24
1.1.2.1.	<i>O vírus HPV</i> .....	24
1.1.2.2.	<i>O HPV e o Câncer Oral</i> .....	28
1.1.3.	Os microRNAs (miRNAs), o HPV e o Câncer Oral.....	29
2.	JUSTIFICATIVA .....	30
3.	OBJETIVOS.....	34
3.1.	Objetivo Geral.....	34
3.2.	Objetivos Específicos.....	34
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1.	Coleta das amostras .....	35
4.2.	Identificação da Presença do HPV ( <i>Nested PCR</i> ) .....	35
4.3.	Extração do RNA total e confecção dos cDNAs dos miRNAs.....	38
4.4.	Avaliação dos miRNAs por PCR quantitativa (qPCR).....	38
4.5.	Análise dos dados.....	39
5.	RESULTADOS.....	40

<b>5.1.</b>	<b>Caracterização da população analisada.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2.</b>	<b>Identificação da presença do HPV nas amostras de CCEO por Nested PCR.....</b>	<b>42</b>
<b>5.3.</b>	<b>Avaliação da presença de miR-145 nas amostras de CCEO por qPCR.....</b>	<b>43</b>
<b>5.4.</b>	<b>Associação entre a presença do HPV, com a expressão de miR-145, os dados demográficos e clínicopatológicos....</b>	<b>44</b>
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>51</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>59</b>
	<b>ANEXO I - Anuência do Comitê de Ética e Pesquisa da Unigranrio.....</b>	<b>59</b>
	<b>ANEXO II – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....</b>	<b>62</b>

## **RESUMO**

Os fatores etiológicos mais importantes para o desenvolvimento do carcinoma de células escamosas oral (CCEO) são o tabagismo e o etilismo. Dados na literatura associaram a presença do papiloma vírus humano (HPV) com o surgimento de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) e o CCEO. Pesquisas têm demonstrado que esses tipos de cânceres associados ao HPV positivo possuem características diferentes quanto à epidemiologia e prognóstico. A malignidade associada ao HPV está relacionada as proteínas E6 e E7, que influenciam a expressão de microRNAs (miRNAs), pequenos RNA não codificantes que sempre mais estão sendo associados com diagnóstico precoce e preditivo de doenças. Entre eles, o miRNA-145 (miR-145) parece ser um fator vital para a agressividade e o prognóstico do tumor. Portanto, este trabalho tem como objetivo analisar a correlação entre a expressão do miRNA-145 e a positividade ao vírus do papiloma humano 16 (HPV16) em 18 amostras coletadas de pacientes portadores de CCEO na Clínica de Estomatologia da UNIGRANRIO. Estes pacientes foram categorizados quanto a: gênero, idade, etnia, hábitos (tabagismo, etilismo, etc), localização e diferenciação histológica das amostras. Para identificação da presença do HPV será utilizado o método Nested PCR e, em seguida, será realizada a extração de miRNAs e a PCR quantitativa q (PCR) para avaliar a expressão do miRNA-145 nas diferentes amostras. Análise estatísticas serão realizados para avaliar a correlação entre esta expressão e a presença de HPV. As amostras coletadas mostraram um perfil demográfico compatível com as características epidemiológicas da doença: homens com mais de 60 anos, prevalentemente fumantes e etilistas que apresentaram lesões na língua e no assoalho bucal.

**Palavras-Chaves:** Carcinoma de Células Escamosas Oral; HPV; miRNA-145.

## **ABSTRACT**

The most important etiological factors for the development of oral squamous cell carcinoma (CCEO) are smoking and alcohol consumption. Data in the literature associated the presence of human papilloma virus (HPV) with the appearance of squamous cell carcinoma of the head and neck (CCECP) and the CCEO. Research has shown that these types of cancers associated with HPV positive have different characteristics in terms of epidemiology and prognosis. The malignancy associated with HPV is related to proteins E6 and E7, which influence the expression of microRNAs (miRNAs), small non-coding RNAs that are always more associated with early and predictive diagnosis of diseases. Among them, miRNA-145 (miR-145) appears to be a vital factor in the aggressiveness and prognosis of the tumor. Therefore, this work aims to analyze the correlation between miRNA-145 expression and positivity to human papilloma virus 16 (HPV16) in 18 samples collected from patients with SCC at the Stomatology Clinic of UNIGRANRIO. These patients were categorized according to: gender, age, ethnicity, habits (smoking, drinking, etc.), location and histological differentiation of the samples. To identify the presence of HPV, the Nested PCR method will be used and, afterwards, miRNAs extraction and quantitative PCR q (PCR) will be performed to evaluate the expression of miRNA-145 in the different samples. Analytical statistics will be performed to assess the correlation between this expression and the presence of HPV. The collected samples showed a demographic profile compatible with the epidemiological characteristics of the disease: men over 60 years old, predominantly smokers and alcoholics who had lesions on the tongue and on the oral floor.

**Keywords:** Oral Squamous Cell Carcinoma, miRNA-145, HPV.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, 2023	16
<b>Figura 2</b>	Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da cavidade oral), 2023	17
<b>Figura 3</b>	Taxas brutas de incidência estimadas para 2023 por sexo, segundo Estado e capital do Rio de Janeiro, 2023	18
<b>Figura 4</b>	Distribuição dos óbitos por neoplasias malignas de lábio e cavidade oral segundo faixa etária, 2018.	19
<b>Figura 5</b>	Genoma do HPV	25
<b>Figura 6</b>	Histologia do Tecido Infectado com HPV x Tecido Normal	27
<b>Figura 7</b>	Mecanismo de ação das oncoproteínas E6 e E7.	28
<b>Figura 8</b>	MiRNAs no Processo de Oncogênese	30
<b>Figura 9</b>	Inativação de p53 e pRb pelas proteínas do HPV	31
<b>Figura 10</b>	Fotografia de uma corrida eletroforética de <i>Nested</i> PCR para o pool de <i>primers</i> PGMY09, PGMY11 e gene constitutivo HLA <sub>DQ</sub> .	41
<b>Figura 11</b>	Fotografia de uma corrida eletroforética da PCR para o <i>primers</i> GP5+/GP6+.	42
<b>Figura 12</b>	Expressão de miR-145a em amostras de CCEO	43

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

<b>Quadro 1</b> - Sequência de primers para a amplificação de um fragmento de 450 pb para detecção do genoma do HPV.....	36
<b>Quadro 2</b> - Sequência de primers para a amplificação de um fragmento de 150 pb para detecção do genoma do HPV.....	37
<b>Tabela 1</b> - Características sócio demográficas e clínico patológicas dos pacientes com CCEO diagnosticados na Clínica de Estomatologia da Unigranrio no período de 2015 a 2016.....	40
<b>Tabela 2</b> - Dados demográficos e clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEO e correlação com expressão de miR-145a.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADH -	Enzima álcool desidrogenase
ALDH -	Aldeído desidrogenase
CASP8 -	Caspase 8
CCEC -	Carcinoma de células escamosas cutâneo
CCEO -	Carcinoma de células escamosas
cDNA -	Ácido desoxirribonucleico complementar
DNA -	Ácido desoxirribonucleico
EGF -	Fator de crescimento epidérmico
E2F -	Fator de transcrição
E6-AP -	Biquitina-proteína ligase
HPV -	Papilomavírus humano
HPVs -	Papilomavírus humanos
IARC -	International Agency for Research on Cancer
INCA -	Instituto Nacional do Câncer
miR-145 -	miRNA-145
miRNAs -	microRNAs
NNN -	N-nitrosornicotina
NNK -	4- (metilnitrosamino) -1- (3-piridil) -1-butanona
OMS-	Organização Mundial de Saúde
ORFs -	Fase de leitura aberta
PCR -	Reação em cadeia da polimerase
PIK3CA -	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinase subunidade catalítica alfa
pRB -	Proteína de susceptibilidade ao retinoblastoma

p53 - Proteína de tumor  
RNA- Ácido ribonucleico  
SIM - Sistema de Informação de Mortalidade  
SG- Sobrevida Global

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é considerado o principal problema de saúde pública no cenário mundial, sendo uma das principais causas de morte e, como consequência, um dos principais empecilhos para o aumento da expectativa de vida. Na maioria dos países, corresponde à primeira ou à segunda causa de morte prematura (<70 anos). O impacto da incidência e mortalidade por câncer está aumentando rapidamente no cenário mundial (SUNG *et al.*, 2021). O envelhecimento e a mudança de comportamento e do ambiente, incluindo mudanças estruturais, que têm impacto na mobilidade, na recreação, na dieta e na exposição a poluentes ambientais, favorecem o aumento da incidência e da mortalidade por câncer (WILD; WEIDERPASS; STEWART, 2020).

Os cânceres encontrados nas regiões da cavidade oral, orofaringe e lábios representam um problema de saúde crescente no mundo. A maioria dos tumores decorrentes dessas três sub localidades são carcinomas de células escamosas (CCE), entretanto os fatores etiológicos envolvidos com a gênese de cada sub localidade são distintos. Além disso, os cânceres decorrentes de diferentes sítios anatômicos demonstram comportamentos biológicos diferentes, assim como, prognósticos e tratamentos (GULSEN *et al.*, 2019).

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) está dentre os tipos mais comuns de neoplasias malignas, chegando a aproximadamente 90% dos cânceres mais incidentes nesta região. O CCE de cabeça e pescoço (CCEP) costuma ser altamente agressivo, especialmente em pacientes jovens (<40 anos), tendo um péssimo prognóstico devido a metástases, quando diagnosticado em estágios avançados (III-IV) (PPORCHERI *et al.*, 2019).

Além da utilização de tabaco e o uso abusivo de álcool como fatores extrínsecos, os CCEs de orofaringe tem o HPV como fator etiológico. O HPV tem sido apontado como o agente etiológico para o seu desenvolvimento do CCE, principalmente nas localidades da base da língua e na área tonsilar, especialmente em indivíduos mais jovens. O HPV-16 recebeu atenção por ser o subtipo mais comumente encontrado na cavidade oral (DHANUTHAI *et al.*, 2019).

Verma *et al.* (2017) avaliaram a presença do HPV em 116 amostras de tecido fresco e 30 amostras de parafina confirmados clínica e histopatologicamente como CCEO e CCE de orofaringe. Esses autores verificaram que 17,5% das amostras CCEO e 39,4% de CCE de orofaringe foram positivas para o HPV. Segundo esses autores, CCEs positivos para o HPV foram mais prevalentes na faixa etária mais jovem, sem histórico de consumo de tabaco e/ou álcool. Em dados de 2018, a proporção de CCE de orofaringe positivo para HPV foi de 56% na América do Norte, 52% no Japão, 45% na Austrália, 39% na Europa do Norte e Ocidental, 38% na Europa Oriental, 17% na Europa Oriental, 17% na Europa Meridional e 13% nos demais do mundo (DHANUTHAI *et al.*, 2018).

Apesar dos avanços no tratamento do CCEO, que inclui principalmente cirurgia e radioterapia, a sobrevida em 5 anos permaneceu aproximadamente em 50% nos últimos 10 anos. O fracasso no tratamento e a redução da sobrevida incluem o diagnóstico tardio, resistência às terapias, recorrência local e metástases à distância. (BANO *et al.*, 2018). Outrossim, os cânceres de orofaringe HPV positivos tem demonstrado um prognóstico melhor quando nos referimos a sobrevida global e livre de doença em comparação com os cânceres HPV negativos de estágio comparável. Apesar disso, questões sobre a precisão dos diferentes testes de HPV e se o HPV é um fator importante na diferenciação e tratamento de tumores da cavidade oral ainda precisam ser estudadas (BEYNON *et al.*, 2018).

A relação entre microRNAs (miRNAs) e os fatores associados a transformação maligna baseada nas oncoproteínas virais E6 e E7 do HPV já é descrita na literatura. A interação entre E7 e p21 resulta na inibição de ciclinas que são alvos por exemplo do miR-15, miR195 e miR49. Essa interação interrompe o ciclo celular e induz à oncogênese. E7 também inativa a proteína supressora tumoral pRB. Já a proteína E6 e a proteína associada à E6 (E6-AP), levam a degradação da p53, inativando o processo de apoptose, após dano do DNA. A proteína E6 também inativa o supressor tumoral p53, resultando em aumento da via oncogênica (LAJER *et al.*, 2012).

Os miRNAs são fragmentos pequenos, de cadeia simples, não codificantes (18 a 25 nucleotídeos) envolvidos em processos regulatórios tanto em nível genético, quanto celular (Heawchaiyaphum *et al.* 2021). Durante muitos anos, tem havido interesse em pesquisas no que diz respeito ao uso de miRNAs como potenciais biomarcadores diagnósticos e prognósticos em muitos tipos de câncer. Com base em

vários estudos, pode-se presumir que os miRNAs (por exemplo microRNA-let-7a, miR-125b, miR-146b-3p, miR-638, miR-31, miR-218, miR-454-3p e miRNA- 936) poderiam desempenhar um papel importante no direcionamento da expressão de *E2F2*. Podendo estar envolvido na progressão do câncer, na sobrevida global dos pacientes e na resposta à radioquimioterapia (GOLABEK *et al.*, 2023)

Pacientes portadores de HPV em associação com CCE de orofaringe, fazem parte de um grupo distinto, possuindo diferentes fatores epidemiológicos e distintos prognósticos em comparação com pacientes que são HPV negativos. Até a presente data, são poucos dados que estabeleçam a influência do HPV sobre os miRNAs no CCE de cavidade oral. Sendo assim, este estudo busca avaliar a influência do HPV na expressão de miR-145a, um miRNA envolvido na via do HPV, em amostras de CCEO.

## **1.1. REVISÃO DE LITERATURA**

### **1.1.1. O Câncer Oral**

#### **1.1.1.1. *Epidemiologia***

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2020, 657.000 novos casos de câncer de cavidade oral e faringe são diagnosticados a cada ano, sendo mais de 330.000 mortes provocadas por esta doença (OMS, 2020). Dados da literatura revelam a prevalência de CCEO em 0,15% na Austrália (Spencer *et al.*, 2014), porém inferior à Tailândia em que essa proporção foi de 6,23% (KINTARAK *et al.* 2016), 8,2% na Líbia (KATZ *et al.*, 2015), 14,82% nos Emirados Árabes Unidos (ANIS e GABALLAH, 2013), 18,0% da Nigéria (OMITOLA *et al.*, 2007) e 24,8% no Zimbábue (CHIDZONGA 2006).

Para o Brasil, a estimativa para o triênio de 2023 a 2025 aponta que ocorrerão 704 mil casos novos de câncer (483 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma), sendo estimados 15.100 novos casos de câncer oral, sendo de suma importância uma equipe de saúde preparada para realizar o diagnóstico precoce, que inclua profissionais capacitados para exame clínico e, quando necessário, a realização de biópsias, patologistas para emitirem os laudos anatomopatológicos e regulação eficiente para início do tratamento oncológico com rapidez dos casos confirmados (INCA, 2023). Os dados mostram como o câncer oral representa o quinto

tipo de tumor mais prevalente em homens com 11 mil novos casos (3,2%), enquanto nas mulheres este câncer não aparece como um dos mais prevalentes (INCA, 2023) (**Figura 1**).

**Figura 1:** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma\*

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens	Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

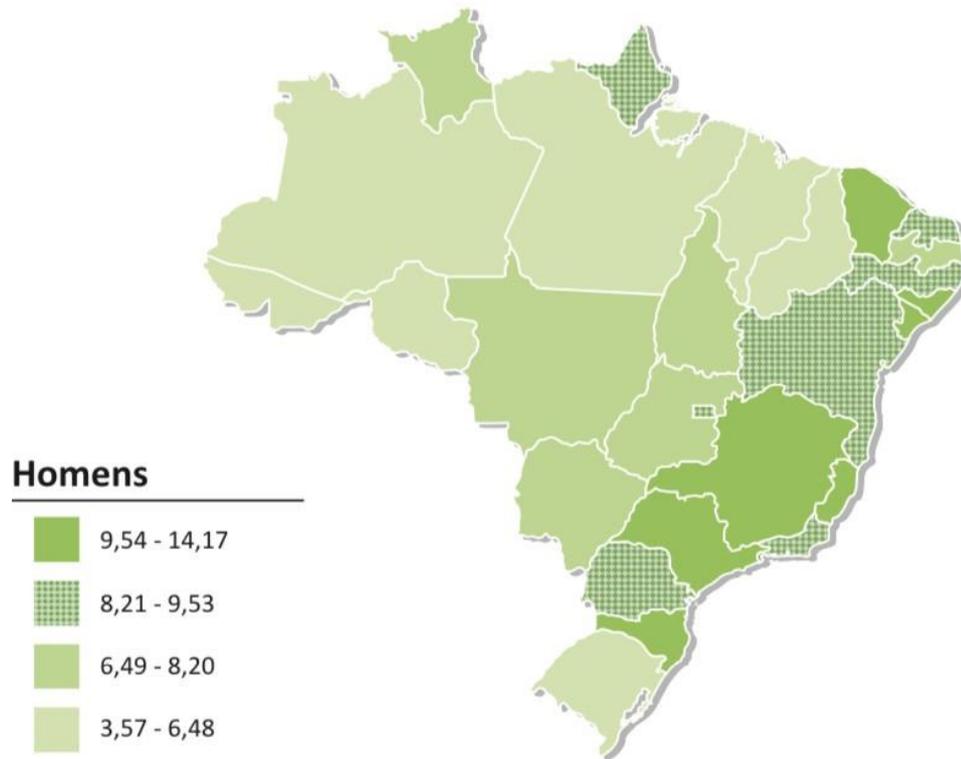
\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2023

**Legenda:** Os tipos de câncer mais frequentes em homens, serão próstata (30%), cólon e reto (9,2%), pulmão (7,5%), estômago (5,6%) e cavidade oral (4,6%). Nas mulheres, os cânceres de mama (30,1%), cólon e reto (9,7%), colo do útero (7%), pulmão (5,8%) e tireoide (5,8%) figurarão entre os principais.

No Brasil, em 2020, ocorreram 6.192 óbitos por câncer da cavidade oral, correspondendo a um risco de morte de 2,92 por 100 mil habitantes. Entre os homens, foram 4.767 óbitos (4,60 por 100 mil) e, em mulheres, 1.425 (1,32 por 100 mil) (BRASIL, 2022; INCA, 2020) (**Figura 2**).

**Figura 2:** Representação espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da cavidade oral)

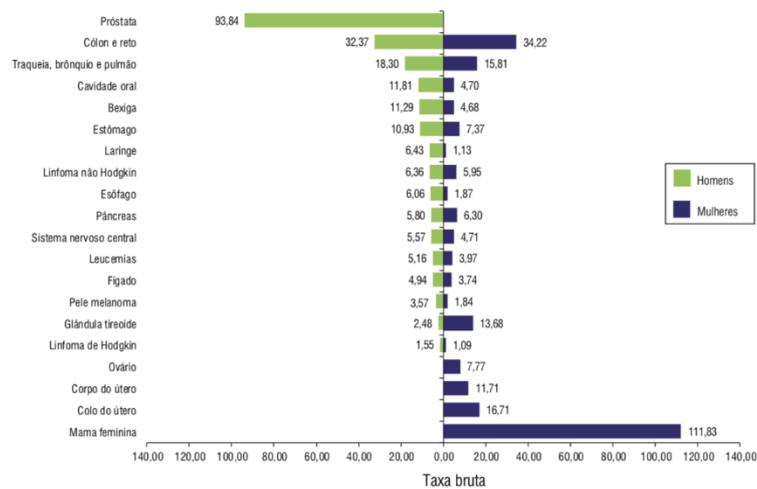


**Fonte:** INCA, 2023

**Legenda:** O câncer da cavidade oral ocupa a oitava posição entre os tipos de câncer mais frequentes. Em homens, é o quarto mais frequente na Região Sudeste (13,16 por 100 mil) e o quinto nas Regiões Nordeste (8,35 por 100 mil), Centro-oeste (8,14 por 100 mil) e Norte (4,53 por 100 mil). Na Região Sul (10,52 por 100 mil), ocupa a sexta posição. Entre as mulheres, é o 13o nas Regiões Sudeste (4,37 por 100 mil), Nordeste (3,87 por 100 mil) e Norte (1,96 por 100 mil). Já na Região Centro-oeste (3,21 por 100 mil), ocupa a 15a posição. Na Região Sul (3,60 por 100 mil), está na 16a posição.

Em relação ao sexo, a maioria dos pacientes são do sexo masculino, com uma proporção de homem para mulher de 2,22: 1 (GHANTOUS *et al.*, 2017). Entretanto, como a Malásia e a Tailândia são países vizinhos, os moradores são expostos a um tipo de ambiente semelhante e compartilham algumas práticas culturais; portanto, ambos os países provocam uma predileção feminina. Além disso, mais pacientes do sexo feminino procuram atendimento médico do que pacientes do sexo masculino na Tailândia. No estado do Rio de Janeiro, a estimativa demonstra que os portadores de CCEO são em sua maioria do sexo masculino, ocupando a quarta posição (INCA, 2023). **(Figura 3).**

**Figura 3:** Taxas brutas de incidência estimadas para 2023 por sexo, segundo Estado e capital do Rio de Janeiro



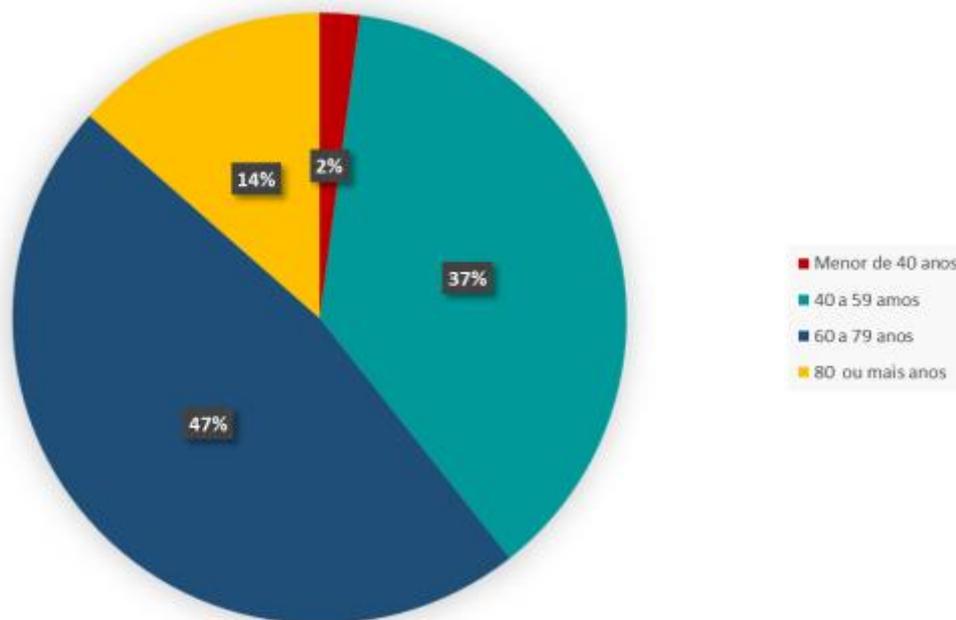
\*Valores por 100 mil habitantes.

Fonte: INCA, 2023.

**Legenda:** No Rio de Janeiro o câncer oral apresenta-se o quarto câncer mais incidente em homens décimo segundo em mulheres.

A faixa etária que apresenta maior manifestação de CCEO está entre a população idosa entre 60-79 anos (47%), onde deve-se considerar a qualidade de vida, assistência à saúde e estilo de vida. Já a menor incidência, permanece entre a faixa etária com menos de 40 anos. Em relação à idade de maior incidência no CCEO nos diversos países, a idade média de pacientes foi de 54,9 anos nos Emirados Árabes Unidos, 59,13 anos na Tailândia, 61,2 anos no Irã, 61,2 anos na Malásia, 62,5 na Jordânia, 65,2 anos no Japão, 42,2 anos na Nigéria, 46,0 na Líbia e 47,8 na Índia (Speight et al. 2017). Em relação aos óbitos por CCEO, no Brasil a faixa etária mais acometida é de 60 a 79 anos com 47% dos casos, seguida pelo 37% dos casos entre 40 e 59 anos e apenas 14% dos casos em idosos com mais que 80 anos e 2% em pessoas com menos que 40 anos (Altas de Mortalidade de 2020, INCA). **(Figura 4).**

**Figura 4:** Distribuição dos óbitos por neoplasias malignas de lábio e cavidade oral segundo faixa etária. Brasil, 2018.



**Fonte:** Altas de Mortalidade de 2020, INCA.

**Legenda:** A incidência entre as idades de 60-79 anos é maior, estando em 47%, seguida da faixa etária 40-59 anos com 37%. Sendo as menores taxas na faixa de 80 anos ou mais em 14% e a menor registrada em menores de 40 anos com 2%.

O uso de tabaco, álcool e noz de areca são algumas das principais causas para o desenvolvimento do CCEO. Na Europa e América do Norte, as infecções pelo HPV são responsáveis pelo crescente número de casos de cânceres de orofaringe entre os jovens (MEHANNA *et al.*, 2013).

#### 1.1.1.2. Etiopatogenia

Do ponto de vista biológico, o câncer é definido como uma doença provocada pelo crescimento descontrolado e desorganizado de células, resultado de alterações no processo de divisão celular (PEREIRA e OLIVEIRA, 2019). Já está estabelecido que o consumo de tabaco, inclusive sem fumaça e o consumo frequente de álcool, são os fatores etiológicos principais para o desenvolvimento do câncer de boca, com efeito sinérgico entre estas duas substâncias. Outros fatores de risco têm sido apontados

no desenvolvimento de câncer bucal como: má higiene bucal, infecções virais, exposição ocupacional, desnutrição e genética (DHANUTHAI *et al.*, 2018).

A fumaça do cigarro pode conter até mais de 60 componentes cancerígenos. Foi comprovado em estudos que as N-nitrosaminas específicas presentes no tabaco, especialmente 4- (metilnitrosamina) -1- (3-piridil) -1-butanona (NNK) e N'-nitrosonornicotina (NNN), induziram a formação de câncer oral em animais. O NNK é ativado pelo metabolismo animal através dos citocromos P450 em metabólitos, reativos ao DNA que induzem a metilação, assim como a piridiloxobutilização de nucleobases no DNA, resultando em adutos de DNA. Para NNN, as vias 2- e 5- $\alpha$ -hidroxilação são as principais vias que levam à formação dos adutos. Os adutos podem resultar na indução de mutações deletérias nos oncogenes e genes supressores de tumores, podendo ser considerados o início do processo tumoral (SCULLY, 2011).

Estudos anteriores demonstraram que o consumo de álcool é um fator de risco dependente da dose. O álcool, primeiramente é oxidado em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase (ADH). De acordo com o IARC, o acetaldeído é considerado um agente cancerígeno pertencente ao tipo I, que são as substâncias comprovadamente cancerígenas em seres humanos. O acetaldeído é posteriormente metabolizado em acetato pelo aldeído desidrogenase (ALDH). Qualquer alteração nessas enzimas (ADH e ALDH) pode influenciar o processo de carcinogênese. O álcool também pode promover a indução da proliferação das células basais e gerar radicais livres, que possuem efeitos deletérios ao DNA, podendo gerar mutações, além de comprometer a capacidade do organismo de absorver e decompor nutrientes, assim como a supressão imunológica, podendo assim, induzir o processo de carcinogênese (SENG *et al.*, 2010).

Os subtipos de HPV16 e HPV18 estão epidemiologicamente relacionados aos CCEs de orofaringe. Estes subtipos, são considerados de alto risco, sendo também os mais comuns nos tumores da cavidade oral (SPRIGGS e LAIMINS, 2017). A presença do vírus do HPV pode funcionar como triagem clínica relacionada à agressividade do tumor (se apresentando de forma mais favorável em pacientes com carcinomas positivos para o vírus HPV e contrariamente nos casos HPV negativos (YOU, HENRY E ZEITOUNI, 2019). Em sua maioria, os tumores HPV negativos possuem mutações em TP53 e CASP8 e uma considerável proporção de tumores HPV positivos, abrigam mutações em PIK3CA.

Questões sobre a precisão dos diferentes testes de HPV, e se o HPV é um fator importante na diferenciação e tratamento de tumores da cavidade oral ainda precisam ser estudadas (BEYNON *et al.*, 2018). O papel do HPV no prognóstico do carcinoma de células escamosas e na resposta aos tratamentos dos pacientes é ainda pouco esclarecido (CHATTOPADHYAY *et al.*, 2019).1.1.

### **1.1.1.3. Aspectos Clínicos**

Nos estágios iniciais os cânceres orais são frequentemente assintomáticos e podem se manifestar como regiões avermelhadas, como pequenos aumentos de volume na mucosa ou como ulcerações. Em alguns casos, pode haver algum desconforto (VARELA *et al.*, 2016). Em estágios avançados os pacientes relatam a presença de ulceração ou crescimento na cavidade oral, mobilidade nos dentes, dor, halitose, salivação excessiva, sangramento, dificuldade para falar e engolir, dor na região do ouvido, inchaço e ulceração da face e pescoço com aumento de volume (SANTOS *et al.*, 2018).

A variação dos sintomas depende do local envolvido pelo tumor. No início, geralmente essas lesões podem surgir de lesões potencialmente malignas preexistentes como as leucoplasias e eritroplasias (SANTOS *et al.*, 2010). Podem apresentar-se em forma de nódulo endurecido, um crescimento exofítico, uma lesão ulcerada e infiltrativa, ou como um crescimento verrucoso. Qualquer local da cavidade oral pode ser afetado, porém o câncer de língua está entre os CCE intraorais mais diagnosticados, variando entre 25-40%. E junto aos carcinomas de assoalho de boca são responsáveis por mais da metade dos carcinomas intraorais (SANTOS *et al.*, 2016; ION *et al.*, 2018). À medida que o tumor avança, ele se infiltra em tecidos adjacentes, como músculo, ossos ou pele, para estruturas adjacentes e para linfonodos. O envolvimento regional dos linfonodos piora o prognóstico (WOOLGAR, 2006).

A disseminação linfática geralmente é para os nódulos ipsilaterais, exceto em tumores localizados ou que se estendem até a linha média. Os nódulos submandibulares, submentonianos e cervicais profundos superiores são mais comumente afetados. À medida que a doença avança, outros nódulos cervicais também são afetados. No caso dos tumores da língua e do assoalho da boca, o envolvimento linfático pode ocorrer mesmo em pequenas lesões primárias. A disseminação hematogênica é rara, sendo o pulmão e a coluna os órgãos comumente

afetados. A via linfática é a via de disseminação mais importante de disseminação (DANTAS *et al.*, 2019).

#### **1.1.1.4. Diagnóstico e Tratamento**

A biópsia incisional, seguida de análise macro e microscópica do material obtido, continua sendo um dos procedimentos mais adequados para o diagnóstico do CCEO. Além disso, uma biópsia fornece uma amostra mais representativa da mucosa oral em comparação com a citologia esfoliativa, e também inclui células da camada basal. No caso da avaliação da presença do HPV, o vírus pode estar presente em uma forma latente e não produtiva nas células da camada basal (LONGWORTH, 2004) (PPO *et al.*, 2002) (WEBER *et al.*, 2015).

O diagnóstico do câncer oral pode ser feito através de exame clínico, mas a confirmação dependerá da biópsia. A tomografia computadorizada, também pode auxiliar no diagnóstico, principalmente para avaliar a extensão da lesão. O diagnóstico precoce permite um tratamento com melhor resultado/prognóstico, enquanto em tumores diagnosticados em estágios mais avançados estão implicados tratamentos mais agressivos com maior chance de sequelas (INCA, 2020; BERNARD *et al.*, 2023; VARELA *et al.*, 2016).

O tratamento do CCEO consiste em cirurgia isolada ou em associação com radioterapia e quimioterapia. A cirurgia consiste na remoção da área comprometida pelo tumor e a remoção dos linfonodos do pescoço, além de reconstrução quando necessário. Lesões mais simples, na maioria das vezes apenas a retirada da lesão é necessária. Nos casos mais avançados, a associação do tratamento cirúrgico e radioterapia e quimioterapia para complementar o tratamento e obter melhor resultado curativo, são necessários (INCA, 2020; BERNARD *et al.*, 2023; VARELA *et al.*, 2016).

#### **1.1.1.5. Aspectos Histopatológicos**

O epitélio da mucosa oral contém camadas com grau variável de diferenciação. Entre o epitélio estratificado e o compartimento mesenquimal, está localizada a membrana basal. As células desta camada são morfologicamente redondas e proliferativas. A proporção de tamanho nuclear *versus* tamanho citoplasmático é reduzida, quanto mais as células se diferenciam e migram para a

camada externa, mais elas se achatam e se tornam escamosas. O estrato espinhoso possui maior volume em relação às células (GHANTOUS *et al.*, 2017). Estas são mais escamosas e produzem queratinas específicas para diferenciação. A camada granular é constituída por células morfologicamente achatadas que contém grânulos de querato-hialina basofílicos e filamentos de queratina. A camada mais externa é o extrato córneo, constituído por uma camada queratinizada pura. Acima da submucosa, são encontrados os vasos sanguíneos, glândulas salivares menores, nervos, fibras estruturais, fibroblastos e outros tipos de células, e onde se localiza o extrato basal. O extrato basal consiste em uma camada de células morfologicamente chamadas de cuboidais e cogita-se que abrigue as células indiferenciadas do epitélio. As células cuboidais do extrato basal, possuem organelas típicas para células produtoras de proteínas e expressam filamentos intermediários de citoqueratina, respectivamente. As células basais se dividem continuamente e se diferenciam em relação às camadas externas (WARNAKULASURIYA, 2008).

A diferenciação escamosa, muitas vezes observada pela formação de “pérolas de queratina” além do crescimento invasivo são, pré-requisitos importantes para a caracterização histopatológica do CCE. A invasão se observa com a ruptura da membrana basal e invasão do tecido subjacente, acompanhada na maioria das vezes por uma reação estromal. Os CCEs podem ser tradicionalmente classificados como bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados. Os CCEs bem diferenciados apresentam semelhanças com o epitélio escamoso normal. Já no CCE moderadamente diferenciado podemos observar a presença de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica, incluindo mitoses atípicas e geralmente apresentam menos queratinização. A maioria dos CCE são moderadamente diferenciados. No CCE pouco diferenciado, predominam células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas e o grau de queratinização é mínimo. Embora a queratinização (BARNES, 2005).

No estágio inicial do câncer bucal, as células sofrem hiperproliferação, aumentando seu número no terço inferior do epitélio, porém exibindo um programa de diferenciação normal. Nos estágios avançados, as células escamosas se tornam displásicas, altamente proliferativas e morfologicamente anormais, começando a se infiltrar em diferentes camadas do epitélio. Por fim, essas células degradam a membrana basal subepitelial e invadem a estrutura do tecido subjacente, adquirindo a capacidade de invadir tecidos distantes e formar metástases (MÉNDEZ *et al.*, 2016).

#### **1.1.1.6. Prognóstico**

Vários fatores associados ao tumor primário e aos linfonodos regionais foram considerados indicadores de predição do resultado do tratamento. O tamanho do tumor primário afeta a escolha e o resultado do tratamento. Os tumores de grande tamanho têm um prognóstico ruim. Porém, a espessura do tumor é mais importante do que o diâmetro na previsão de metástases, recorrências e sobrevida. A aparência clínica e a proporção de crescimentos exofítico ou endofítico também são considerados preditores do resultado do tratamento. Uma redução gradual na sobrevida de 5 anos foi relatada para tumores localizados posteriormente na cavidade oral. As metástases são mais comuns para tumores de língua e região retromolar em comparação com o lábio e mucosa oral (YUEN *et. al.*, 2002).

O envolvimento ósseo do tipo infiltrante está associado a um risco aumentado de recorrências locais e baixa sobrevida em comparação com um tipo erosivo de envolvimento ósseo. Já o envolvimento da pele, quando ocorre disseminação direta, é indicativo de um prognóstico grave (WOOLGAR, 2006)

### **1.1.2. O Papiloma Vírus Humano (HPV)**

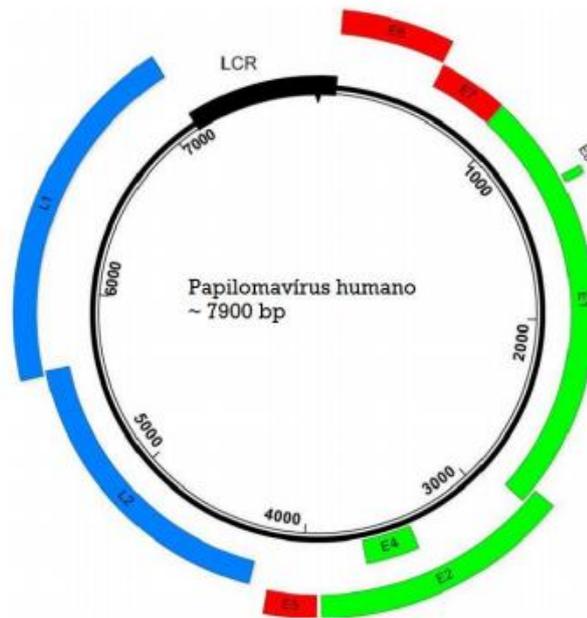
#### **1.1.2.1. O Vírus HPV**

Os papilomavírus são os vírus mais antigos. Datam do final da Era Paleozóica, cerca de 330 milhões de anos atrás. Os vírus do papiloma têm uma ampla diversidade genotípica. Os antigos vírus do papiloma com tropismo da mucosa começaram a se desenvolver há cerca de 90 milhões de anos (BRAVO e SÁNCHEZ, 2015). Durante sua evolução, os papilomavírus humanos (HPVs) se desenvolveram, adquirindo a capacidade de utilizar proteínas celulares humanas para replicação e permanecer em silêncio ao sequestrar os sistemas celular e imunológico (HARDEN e KARLMUNGER, 2017). As manifestações das infecções por HPV podem ser múltiplas, variando de infecções assintomáticas a lesões verrucosas benignas e/ou potencialmente malignas, neoplasia intraepitelial e carcinomas invasivos (CUBIE, 2013).

Até o momento, mais de 205 genótipos diferentes de HPV já foram identificados e colocados em cinco gêneros, dos quais os vírus *Alphapapillomavirus*,

*Betapapillomavirus* e *Gammapapillomavirus* são os mais encontrados. Os vírus do papiloma humano no gênero *alpha* são de importância clínica principal, pois esse gênero contém a maioria dos HPVs da mucosa, que incluem os chamados HPVs de baixo e alto risco. Os HPVs da mucosa considerados de baixo risco, como o HPV- 6 e o HPV-11, causam papiloma/condiloma benigno, enquanto os HPVs da mucosa considerados de alto risco, como o HPV-16 e o HPV-18, causam lesões intraepiteliais escamosas que podem progredir para carcinoma de células escamosas na região da cabeça e pescoço (SYRJÄNEN, 2018).

O papilomavírus humano contém um formato de DNA circular de fita dupla com aproximadamente 8.000 pares de bases sendo sua delimitação através de um capsídeo icosaédrico não envelopado de 55 nm de diâmetro. Somente uma fita do genoma do DNA é transcrita. A sequência contém de 9 a 10 quadros de leitura aberta (ORFs) com possíveis regiões codificadoras de proteínas. A região inicial (E) contém ORFs que codificam proteínas reguladoras virais e a região tardia (L) codifica as duas proteínas virais do capsídeo L1 e L2. A terceira região do genoma é a região de controle longa, também chamada região reguladora ou região não codificante. A região de controle longa contém a origem da replicação do DNA e dos locais de ligação das proteínas celulares virais e do hospedeiro para controlar a transcrição viral (BRAVO e SÁNCHEZ, 2015) (**Figura 5**).

**Figura 5:** Genoma do HPV

**Legenda:** A região de genes iniciais (Early genes- E) são mostrados em verdes e os genes tardios (Late genes- L) são mostrados em azul. A região de LCR, que regula a transcrição e a replicação do DNA viral, é mostrada por uma faixa preta mais espessa. Três oncogenes de HPV, E5, E6 e E7, são mostrados em vermelho. Adaptado de (SPURGEON; LAMBERT, 2017).

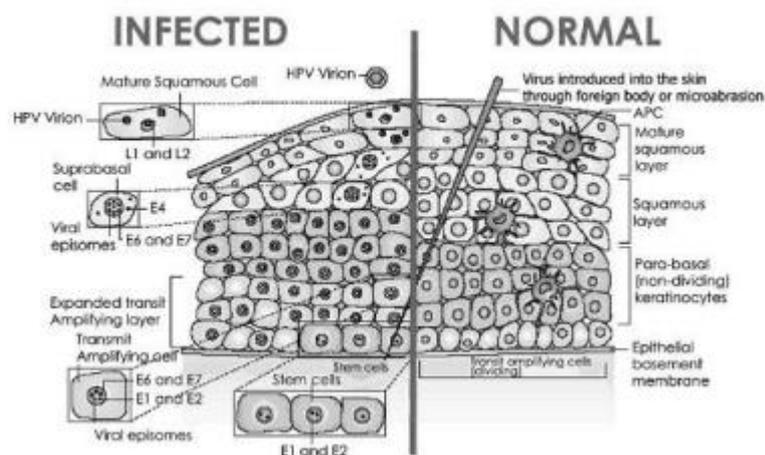
A classificação dos HPVs é baseada na sequência nucleotídica da ORF (*open reading frame*) que codifica a proteína do capsídeo L1, pois essa sequência é a mais conservada entre todos os HPVs. Os tipos de papilomavírus humano com menos de 60% de homologia na parte L1 do genoma pertencem a diferentes subtipos de HPV. Diferentes espécies virais de um gênero compartilham homologia entre 60% e 70%. Os novos tipos de HPV são rotulados em ordem numérica após todo o genoma ter sido clonado e depositado no Centro Internacional de Referência do HPV. Atualmente, o HPV - 16, na espécie 9, é o vírus humano oncogênico mais poderoso conhecido. (VILLIERS *et. al.* 2010).

O ciclo de vida do HPV está ligado à diferenciação das células epiteliais e é regulado por proteínas virais e celulares. No epitélio escamoso normal, as células se estratificam nas camadas basal e suprabasal, sendo que a replicação celular é restrita à camada basal. Após a replicação cromossômica e a divisão celular, uma das duas células filhas migra para cima nas camadas suprabasais, onde sofre diferenciação e

perde a capacidade de permanecer ativa. Os vírus infectam as células na camada basal dos epitélios estratificados, expostos por microlesões. A ligação inicial do HPV com as células é provavelmente através da ligação do *virion* aos proteoglicanos do sulfato de heparina na superfície celular epitelial ou na membrana basal. Após a entrada, os *virions* migram para o núcleo, onde seus genomas são elementos extracromossômicos ou epissomas, com aproximadamente 100 cópias por célula. Nas células basais, os epissomas são replicados, juntamente com o DNA celular, durante a fase S do ciclo celular, com os números de cópias epissomais mantidos em níveis igualmente baixos (SPRIGGS e LAIMINS, 2017).

À medida que as células infectadas se dividem, uma célula filha se move para as camadas suprabasais. Através da ação de proteínas virais, um subconjunto de células diferenciadoras é capaz de permanecer ativo no ciclo celular e progredir para a fase G2. No G2, os genomas do HPV são replicados para milhares de cópias por célula em um processo denominado amplificação, e isso ocorre após a replicação celular ter sido concluída. Simultaneamente à amplificação, a síntese do capsídeo e a montagem do *virion* são induzidas em células diferenciadas, seguidas pela liberação de virions da progênie da superfície celular epitelial (CHOW *et al.*, 2009) (**Figura 6**).

**Figura 6:** Histologia do Tecido Infectado com HPV x Tecido Normal



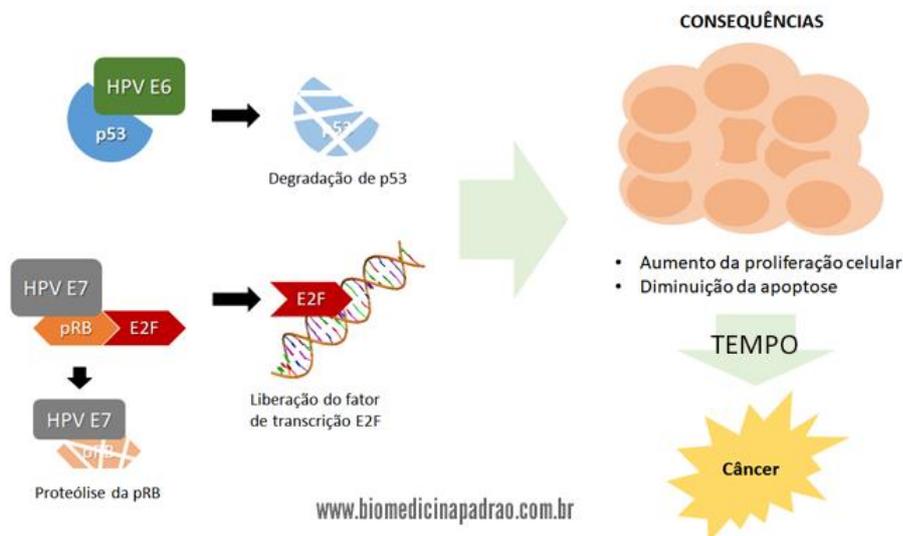
**Legenda:** Proliferação de células infectadas por HPV e formação do papiloma (lado esquerdo) e proliferação celular normal (lado direito) (GISSMAN *et al.* 2006).

### 1.1.2.2. O HPV e o Câncer Oral

Na carcinogênese, o genoma do HPV se integra geralmente ao cromossomo da célula hospedeira. Cada sítio é único, já que a integração é aleatória. Durante este processo, o repressor transcricional, a proteína E2, é frequentemente perdida e a expressão de E6 e E7 são importantes para o processo de carcinogênese. As oncoproteínas E6 e E7 são proteínas de alto risco para o câncer e estão ligadas à capacidade de interferir em vários complexos proteicos reguladores celulares, dos quais os mais importantes são p53 e pRB. (MCBRIDE *et. al.*, 2018)

Com aproximadamente 150 aminoácidos a proteína E6 do HPV-16, degrada e inativa a proteína celular p53 através de proteólise, mediada pela ubiquitina é identificada no núcleo e nas membranas celulares. O complexo E6/E6-AP atua como uma ubiquitina-ligase, conjugando ubiquitina à p53. O aumento da instabilidade genética e acúmulo de mutações oncogênicas está associada a degradação da p53. Nas fases incipientes da progressão tumoral, este mecanismo é essencial (SCHIFFMAN e BURK, 1997; MANSUR, 2001) (**Figura 7**).

**Figura 7:** Mecanismo de ação das oncoproteínas E6 e E7.



**Fonte:** <https://www.biomedicinapadiao.com.br/2019/11/como-o-hpv-de-alto-risco-deixa-celula.html?m=0>

**Legenda:** Degradação da p53 supressora de tumor pela proteína E6. E a proteína E7 que se liga à proteína pRb, provocando a má regulação do ciclo celular de G1 para S, resultando no processo de carcinogênese.

Já com aproximadamente 100 aminoácidos e encontrada no citoplasma e no núcleo das células do hospedeiro, está a proteína E7. Para a ligação com pRB é necessária a porção N-terminal para promover estabilidade. Constituinte um segundo sítio de ligação à pRb, regula negativamente o ciclo celular de G1 para S. Para ocorrer síntese de DNA, a proteína E7 do HPV-16, fosforilada, liga-se às formas hipofosforiladas da pRb, ocorrendo assim a liberação do fator de transcrição E2F, anteriormente associado à pRb. Desta forma, o crescimento celular e a expressão de genes envolvidos na divisão celular se torna anormal de forma ininterrupta. (Schiffman e Burk, 1997; Mansur, 2001). O acúmulo de proteína p16, em alguns tumores relacionados ao vírus HPV é resultado da inativação de p53 e pRb mediada por E6 e E7. A p16 desregula a bomba de prótons, o que resulta na diminuição da degradação dos receptores EGF provocando, estimulação mitogênica prolongada (MANSUR, 2001).

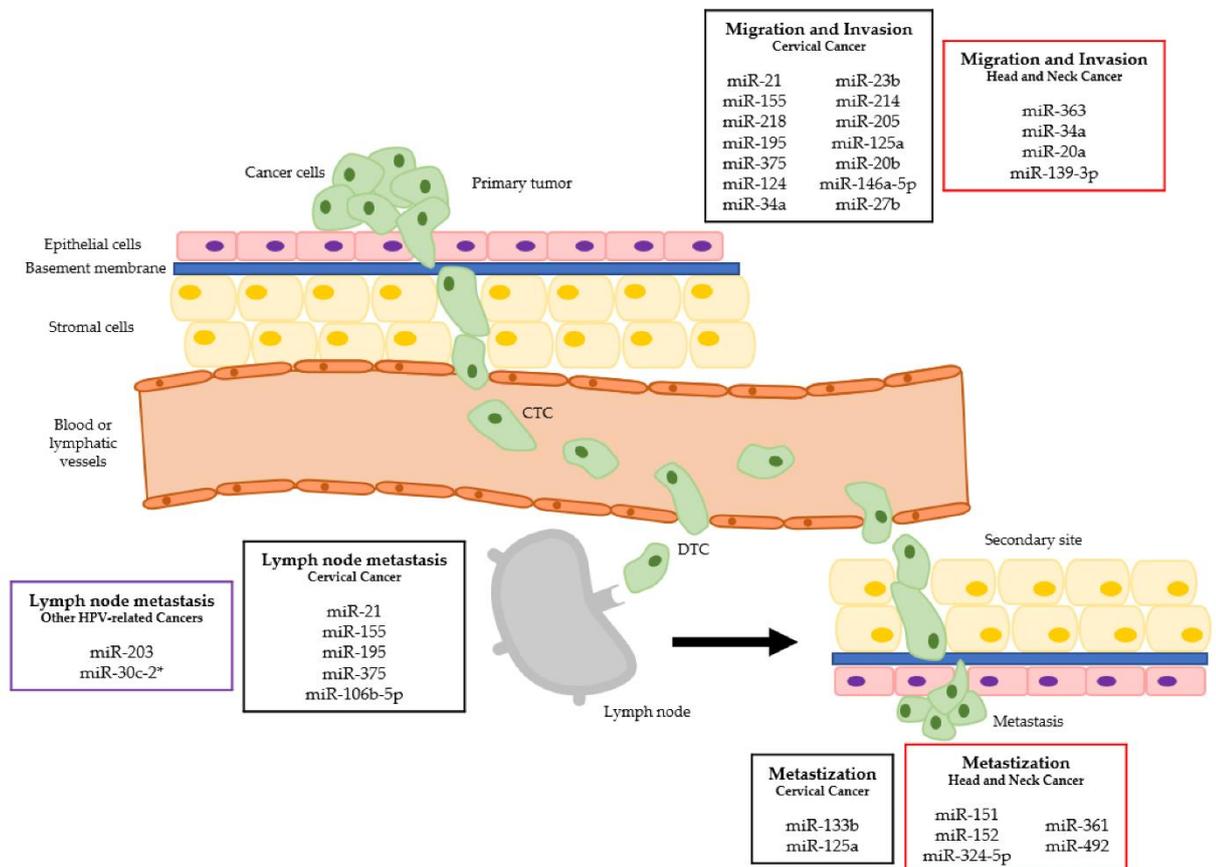
Pacientes portadores de carcinomas orofaríngeos positivos para HPV, tiveram uma melhor sobrevida do que pacientes HPV negativos. O resultado do câncer de orofaringe está relacionado ao *status* do HPV, à metástase nodal e a outros fatores. Um estudo demonstrou que o tabagismo parece modificar a sobrevida e a recorrência de carcinomas positivos para HPV. Dessa forma, os pacientes foram classificados nesse estudo em três categorias, com base no HPV e no tabagismo. A maior sobrevida global em cinco anos (SG) foi observada em pacientes com carcinoma HPV positivo e nunca fumantes (81%), seguidos por pacientes HPV positivos ex fumantes (48%); a SG mais baixa em 5 anos (21,1%) foi encontrada em pacientes HPV negativos fumante (Boon et. al. 2013). Pacientes com CCEO HPV-positivo desfrutam de prognóstico significativamente melhor do que pacientes com CCEO HPV-negativo, e regimes de tratamento específicos para HPV-positivo estão sendo avaliados. Isso demonstra a importância do reconhecimento e diagnóstico corretos de tumores HPV-positivos (POWEL e EVANS, 2015).

### **1.1.3. Os microRNAs (miRNAs), o HPV e o Câncer Oral**

Os microRNAs (miRNAs) são os principais reguladores da expressão gênica na fisiologia e doença humana, a regulação transcricional de miRNAs é pouco compreendida, porque a maioria dos promotores de miRNA ainda não foi caracterizada (OZSOLAK et. al. 2008). Pequenos RNAs não codificantes, como o

miRNA (miR), são altamente conservados e têm cerca de 22 nucleotídeos de comprimento, com importante papel em uma variedade de processos, incluindo desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular. Uma variedade de miRNAs tem múltiplos genes alvo envolvidos no crescimento celular e nas vias de sinalização, desregulação dos quais pode participar em muitos processos celulares fundamentais de vários cânceres, incluindo tumorigênese, proliferação, apoptose, metástase e resistência a drogas (**Figura 8**). Entre eles, o miRNA-145 (miR-145), localizado em uma região frágil do cromossomo 5q, parece ser um fator vital para a agressividade e o prognóstico do tumor (XU *et al.*, 2019).

**Figura 8: MiRNAs no Processo de Oncogênese**



**Fonte:** Santos et al. (2018)

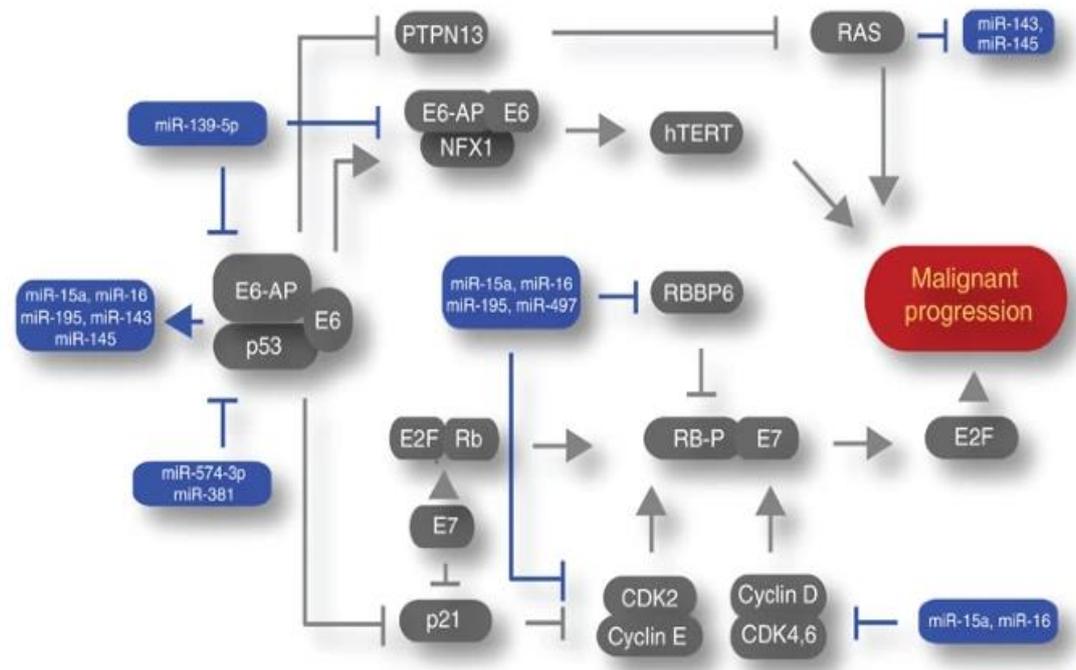
**Legenda:** Os miRNAs oncogênicos possuem expressão aumentada, promovendo o desenvolvimento tumoral através do estímulo à proliferação células ou inibição de genes que regulam apoptose e genes supressores tumorais, permitindo desta forma invasão aos tecidos adjacentes e subjacentes.

Não há consenso sobre miRNAs específicos que estão associados a HPV positivo em CCEO. Portanto, estudos mais aprofundados em uma população de

estudo homogênea e bem descrita, com distinção do local de origem e etiologia do tumor são necessários para se obter um quadro mais claro (BOZINOVIC *et al.*, 2019). Pacientes portadores de CCEO HPV + têm um perfil de miRNA distinto em comparação com pacientes portadores de CCEO e que são HPV-. Um conjunto de miRNAs de núcleo de HPV foi identificado. Destes, especialmente o miR-15a / miR-16 /, miR-143 / miR-145 e o agrupamento miR-106-363 parecem ter alvos dentro da conhecida patogênese do HPV.

Lajer *et al.* (2012), demonstraram em seu estudo a relação entre os miRNAs e os fatores que estão envolvidos no processo de malignidade celular, baseada na ação das oncoproteínas E6 e E7. Ocorrendo nesta via a interação entre E7 e p21, o que acarretaria a inibição de ciclinas que são alvos de miRNAs. Resultando assim na interrupção do ciclo celular e contribuindo para o mecanismo de oncogênese. Eles elaboraram uma hipótese de que a proteínas E6 é capaz de inibir PTPN13 uma molécula inibidora de RAS, levando, portanto, à inibição indireta do miRNA supressor miR-145 (**Figura 9**).

**Figura 9:** Inativação de p53 e pRb pelas proteínas do HPV



**Fonte:** Lager *et al.*, 2012.

**Legenda:** Representação esquemática da relação entre miRNAs regulados por HPV e fatores envolvidos na transformação maligna provocadas pelas oncoproteínas E6 e E7. Proteínas reguladas por miRNA putativos e miRNA controlados por fatores de transformação são indicados em cinza e miRNAs são mostrados em caixas azuis.

O mecanismo preciso do miRNA-145 na supressão tumoral não está bem estabelecido. No entanto, poucas teorias foram sugeridas na literatura sobre seu mecanismo de ação. Heawchaiyaphum *et al.* (2021), sugeriram que os vírus EBV e HPV podem regular a expressão de microRNA do hospedeiro. Recentemente a baixa expressão do miR-145, foi identificada em diversos tipos de tumores (côlon, pâncreas, entre outros). Este miRNA, foi associado ao HPV e ao câncer de cabeça e pescoço. O miR-145 é um supressor de tumor e inibe a migração, invasão e proliferação celular, induzindo a apoptose das células oncogênicas. Observou-se que a regulação negativa do miR-145 está associada a uma sobrevida desfavorável em várias doenças malignas, sugerindo que esta regulação negativa poderia ser usada como um potencial biomarcador prognóstico (HEAWCHAIYAPHUM *et al.*, 2021).

A identificação de miRNAs associados a diferentes cânceres mediados por HPV é importante, pois podem ser úteis como marcadores específicos para o câncer associado ao vírus HPV, qual tem comportamento distinto. Além disso, eles podem ser úteis em futuras estratégias de tratamento individualizado e no desenvolvimento de novas terapias direcionadas.

## 2. JUSTIFICATIVA

A literatura tem demonstrado que o prognóstico em pacientes portadores de CCECP HPV-positivos, é nitidamente mais favorável do que os pacientes CCECP HPV negativos (YOY, HENRY e ZEITOUNI, 2019). Sendo assim, o status de HPV é hoje rotineiramente usado como uma variável de estratificação em níveis de complexidade, em testes médicos e deve ser considerado.

Sabe-se que os pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe HPV positivos apresentam comportamentos epidemiológicos e clínicos diferentes em comparação com pacientes HPV negativos, permitindo a identificação do carcinoma HPV-positivo como uma doença distinta específica com características prognósticas peculiares. Sendo pacientes com CCE de orofaringe HPVs positivos diagnosticados em uma idade mais jovem do que os pacientes HPVs negativos. A taxa de sobrevida de cinco anos para carcinoma de células escamosas de orofaringe HPV-positivo é de 60-90% em comparação com 20-70% HPV-negativo, conferindo um prognóstico mais favorável para pacientes com CCEs HPV-positivos. (LOCATI *et. al.*, 2019)

Portanto, através de análises laboratoriais, este estudo teve por objetivo identificar a correlação entre pacientes portadores de CCEO positivos e a expressão de miR-145, um miRNA supressor que tem sido correlacionado com esta via oncogênica.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar a correlação entre a presença de HPV e a expressão de miR-145 em amostras de pacientes portadores de CCEO.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Identificar a presença do HPV em amostras de CCEO por *Nested* PCR;
- Avaliar a expressão de miR-145 em amostras de CCEO por PCR em tempo real;
- Correlacionar a expressão de miR-145, com a presença do HPV e com os dados clínicos e patológicos nas amostras avaliadas.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Coleta das amostras

Trata-se de um estudo piloto, com uma amostra de conveniência composta por pacientes portadores de CCEO atendidos na Clínica de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da UNIGRANRIO. As amostras de CCEO foram colhidas à fresco durante o ato cirúrgico da biópsia diagnóstica. As amostras foram seccionadas em duas partes. Uma parte, foi coletada em criotubos contendo *RNAlater* foi destinada aos experimentos moleculares e foram armazenadas a temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento de sua utilização. A outra parte foi coletada em formol a 10% e destinadas ao diagnóstico histopatológico na Universidade Federal Fluminense (UFF). Além disso, foram também utilizadas 15 amostras de mucosa normal provenientes de pacientes que não apresentaram nenhuma patologia prévia ou clinicamente diagnosticável em cavidade oral, submetidos a cirurgias pré-protéticas na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UNIGRANRIO. A coleta destas amostras seguiu o mesmo protocolo das amostras de CCEO (coletadas em *RNAlater* e em formol a 10%). A coleta e a utilização das amostras foram autorizadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIGRANRIO (número CAAE 43110714.5.0000.5283 Número do Parecer: 1.024.617) **ANEXO I**.

Os dados da população foram levantados através de questionários aplicados e o termo de consentimento pós-informado foram devidamente assinados por todos os pacientes que se declaram favoráveis à participação no presente estudo e à utilização das amostras (**ANEXO II**).

### 4.2. Identificação da presença do HPV (*Nested PCR*)

Para a detecção do HPV o DNA das amostras de CCEO foi extraído utilizando reagente Trizol e um tampão de extração composto por tiocianato de guanidina 4 M, citrato de sódio 50 mM e TRIS 1 M pH 8,0. Após centrifugação, o precipitado de DNA foi lavado com isopropanol (100%) e etanol (70%), ressuspendido em 25  $\mu\text{l}$  de água e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

A detecção do HPV nas amostras de CCEO foi realizado pelo método de *Nested PCR* de acordo com protocolo proposto por Gravitt *et al.* (2000) e Venceslau *et al* (2014)

utilizando em um primeiro momento um pool de *primers* PGMY09 e PGMY11 que flanqueou no genoma viral um fragmento de 450 pares de base (pb). Além disso, como controle endógeno da reação de PCR, foi utilizado um par de *primers* de uma região conservada do gene *HLAdQ*, que é um componente da molécula do antígeno leucocitário humano, com um fragmento de aproximadamente 200 pb (Quadro 1) e os primers GP5+/GP6+ (Quadro 2), que amplificaram num segundo momento uma sequência de aproximadamente 150 pb que é interna à sequência flanqueada pelos primers.

**Quadro 1.** Sequência de primers PGMY09 e PGMY11 para a amplificação de um fragmento de 450 pb para detecção do genoma do HPV

Primer	Sequência
PGMY09-F	CGTCCCAAAGGAAACTGATC
PGMY09-G	CGACCTAAAGGAAACTGATC
PGMY09-H	CGTCCAAAAGGAAACTGATC
PGMY09-I	GCCAAGGGGAAACTGATC
PGMY09-J	CGTCCCAAAGGATACTGATC
PGMY09-K	CGTCCAAGGGGATACTGATC
PGMY09-L	CGACCTAAAGGGAATTGATC
PGMY09-M	CGACCTAGTGGAAATTGATC
PGMY09-N	CGACCAAGGGGATATTGATC
PGMY09-P	GCCCAACGGAAACTGATC
PGMY09-Q	CGACCCAAGGGAAACTGGTC
PGMY09-R	CGTCCTAAAGGAAACTGGTC
PGMY11-A	GCACAGGGACATAACAATGG
PGMY11-B	GCGCAGGGCCACAATAATGG
PGMY11-C	GCACAGGGACATAATAATGG
PGMY11-D	GCCCAGGGCCACAACAATGG
PGMY11-E	GCTCAGGGTTTAAACAATGG
HMB01	GCGACCCAATGCAAATTGGT
HLAdQ-F	GTGGTGTAACCTGTACCA
HLAdQ-R	GGTAGCAGCGGTAGAGTT

**Quadro 2.** Sequência de primers para a amplificação de um fragmento de 150 pb para detecção do genoma do HPV

Primer	Sequência
Gp5+	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
Gp6+	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC'

As reações foram realizadas utilizando 1 µl (50ng) de DNA genômico, 10 pmoles de cada iniciador (Senso e Antisenso), 12,5µl de AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA) e água estéril, para atingir um volume final de 25 µl.

A amplificação foi realizada usando as seguintes condições de ciclo: incubação a 95°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos de desnaturação de 1 min a 95°C, hibridização de 1 min a 55°C e alongamento de 1 min a 72°C. O último ciclo foi seguido por uma extensão final por 10 min a 72°C e, em seguida, a amostra foi armazenada a 4°C.

O produto final da primeira PCR foi diluído em 1:5, e um microlitro desta amostra e 10 pmoles de cada iniciador (GP5 + / GP6 +), 12,5µl de AmpliTaq Gold™ 360 Master Mix (Applied BioSystems – Life Technologies™, Carlsbad, USA) e água estéril, para atingir um volume final de 25 µl. Os primers GP5 + / GP6 + consistem em uma sequência de nucleotídeos fixa para cada um dos 18 primers da primeira PCR desenhados para detectar uma ampla gama de tipos de HPV usando uma PCR de temperatura de anelamento mais baixa. As condições foram as seguintes nos ciclos de PCR: desnaturação de 95°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, então 40°C por 2 min e 72°C por 1 min e meio. Este último ciclo foi seguido por um período de extensão final de 10 minutos a 72°C.

Foram incluídos durante a amplificação um controle positivo, DNA extraído de células Hela (subtipo HPV-6 de baixo risco) e um controle negativo que foi utilizada uma amostra contendo todos os componentes da reação, exceto o DNA.

Os fragmentos dos genes amplificados nos PCRs primários e secundários, de 450 pb e 140 pb, respectivamente, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com GelRed™ (Biotium) e visualizados no sistema QIAxcel de eletroforese capilar automatizada. Para evitar qualquer contaminação, a mistura de PCR sem DNA foi pipetada em uma sala com uma "estação de PCR com purificação de ar". O DNA foi extraído em condições estéreis em um laboratório separado. O DNA foi adicionado à mistura de reação de PCR em uma terceira sala de laboratório.

### 4.3. Extração do RNA total e confecção dos cDNAs dos miRNAs

A extração do RNA total das amostras foi realizada utilizando o reagente Trizol (Life Technologies - Foster City, CA) de acordo com as especificações do fabricante. Para a confecção dos cDNAs de miR-145 e do endógeno (RNU48) adotamos o *kit MicroRNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific)* e *primers Taqman* para cada miRNA em análise. Para isto, foram utilizados 0,15 µL de dNTPs, 1 µL de *Multiscribe™ RT enzyme* (50 U/ µL), 1,5 µL de *Buffer 10 X*, 0,19 µL de *RNAse inhibitor* (20 U/µL), 4,16 µL de *H<sub>2</sub>O RNAse free*, 3 µL de *primer* (miR-145a e de RNU48). Para a amplificação, aplicamos as seguintes condições: 16 °C por 30 min, 42 °C por 30 min, 85 °C por 5 min.

### 4.4. Avaliação dos miRNAs por PCR quantitativa (qPCR)

A coleta de dados através da técnica de qPCR consiste na medida em que ocorre a reação, onde a amplificação e detecção ocorrem simultaneamente, onde difere-se da PCR convencional, na qual é necessário ter um número pré-determinado de ciclos para ocorrer a detecção. Durante a reação, o resultado desta técnica apresenta-se na forma de gráfico de amplificações. Na fase logarítmica da reação de amplificação, o produto acumulado está diretamente associado à quantidade de molde encontrado no início da reação. O *Cycle threshold* (Ct) é o ciclo da PCR em que o nível de fluorescência ultrapassa o *threshold*. Sendo este, o parâmetro utilizado para quantificar o produto presente no início da reação.

O cálculo da expressão relativa de acordo com o método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  foi utilizado para obter o nível de expressão dos miRNAs. As mudanças na expressão gênica são calculadas através das diferenças entre as amostras calibradoras (grupo peso normal) e as experimentais (sobrepeso e obeso), através do método do  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , ou método comparativo de Ct, qual se trata de uma equação matemática que são normalizadas por uma referência. Ressalta-se que o valor de  $\Delta Ct$  equivale à diferença entre o valor da média dos Cts do gene de interesse e a média dos Cts do gene normalizador. O cálculo da fórmula  $\Delta\Delta Ct$  envolve a subtração entre o valor de  $\Delta Ct$  para cada amostra experimental e o valor de  $\Delta Ct$  para as amostras calibradoras.

O sistema de detecção Taqman (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado para a avaliação da expressão dos miR-145a. O normalizador utilizado foi RNU48. As

reações foram feitas em triplicata, com a presença de um controle negativo de reação, num volume total 20  $\mu\text{L}$  para cada reação e o método da expressão relativa  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ . As reações consistiram na aplicação de 1,33  $\mu\text{L}$  de produto de cDNA, 10  $\mu\text{L}$  2 TaqMan® Universal PCR Master Mix II (2 $\times$ ), no UNG (Applied Biosystems) e 1  $\mu\text{L}$  de TaqMan® Small RNA Assay e 7.67  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O nuclease free. As reações foram realizadas no aparelho QuantStudio 7 (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) e as condições para a amplificação foram: *Hold* de 50 °C por 2 min, *Hold* de 95 °C por 10 min seguidos de 40 ciclos de denaturação 95 °C por 15s e anelamento e extensão 60 °C por 1min. O valor de corte para considerar a diferença de expressão foi de duas vezes (LIVAK e SCHMITTGEN 2001).

#### **4.5. Análise de Dados**

Os dados gerados nesse estudo foram tabulados em uma planilha do Excel e posteriormente analisados. Os resultados da expressão dos miRNAs obtidas neste estudo foram analisados por ferramentas de bioinformática fornecidas pelo fabricante (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA) segundo o método do  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (LIVAK e SCHMITTGEN 2001). Os dados demográficos e clínicopatológicos dos pacientes foram dispostos como frequências absolutas e frequências relativas.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Caracterização da população analisada

Os dados clínico-patológicos e demográficos dos pacientes portadores de CCEO atendidos na Clínica de Estomatologia entre os anos de 2015 e 2016 estão descritos na **Tabela 1**. Em relação ao gênero, a população diagnosticada com o CCEO consistiu em 18 indivíduos, sendo 12 (66,66%) homens e 6 (33,33%) mulheres. A idade dos pacientes variou entre 59 e 90 anos, sendo o grupo de pacientes com mais de 60 anos de idade o de maior prevalência com 15 casos (83,33%). Em relação à etnia, a maioria dos participantes foi composta por brancos (8/44,44%), em seguida por negros (7/38,88%) e pardos (3/16,66%). Em relação à presença de hábitos um total de 9 (47,36%) participantes se declararam tabagistas e o etilismo foi relatado em mais da metade dos participantes (11/61,11%).

Quanto à localização anatômica, a língua foi a região mais comumente afetada pelo CCEO com 44,44% (n=8) dos casos, seguida do assoalho de boca, 33,33% (n=6), palato duro (n=2) 11,11%, rebordo alveolar (n=1) e fundo de vestibulo (n=1), sendo 5,55% cada. Os tumores moderadamente diferenciados, 83,33% (n=15) constituíram o tipo histológico mais comum, seguidos do subtipo bem-diferenciado, 11,11% (n=2) e pouco diferenciado 5,55% (n=1) (Tabela 1).

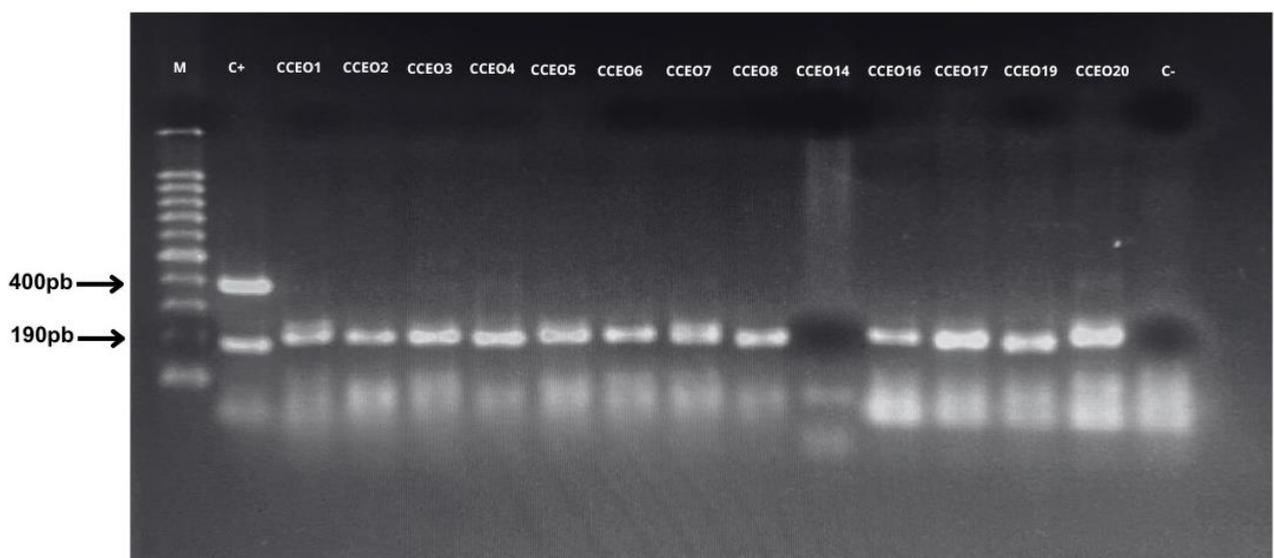
**Tabela 1.** Características sócio demográficas e clínico patológicas dos pacientes com CCEO diagnosticados na Clínica de Estomatologia da Unigranrio no período de 2015 a 2016.

Variáveis	Pacientes diagnosticados com CCEO (N=18)	%
<b>Gênero</b>		
Homens	12	66,66
Mulheres	6	33,33
<b>Idade</b>		
≤ 40 anos	0	0
41-59 anos	3	16,66
≥ 60 anos	15	83,33
<b>Etnia</b>		
Pardos	3	16,66
Branco	8	44,44
Negros	7	38,88
<b>Hábitos</b>		
Alcoolismo	11	61,11
Tabagismo	9	47,36
<b>Localização anatômica</b>		
Língua	8	44,44
Assoalho de boca	6	33,33
Rebordo alveolar	1	5,55
Orofaringe	0	0
Mucosa jugal	0	0
Fundo de vestíbulo	1	5,55
Palato duro	2	11,11
Gengiva	0	0
<b>Grau de diferenciação histopatológica</b>		
Bem-diferenciado	2	11,11
Moderadamente-diferenciado	15	83,33
Pouco diferenciado	1	5,55

## 5.2. Identificação da presença do HPV nas amostras de CCEO por *NESTED PCR*

Com a finalidade de identificar a presença do HPV nas amostras dos pacientes portadores de CCEO participantes desse estudo, foi realizado o método de *Nested PCR* proposto por Gravitt *et al.* (2000) e Venceslau *et al.* (2014). Nesse método foi utilizado um *pool* de *primers* PGMY09 e PGMY11 que flanqueou no genoma viral, permitindo a amplificação de um fragmento de 450 pares de base (pb). Para o controle da integridade do DNA foi utilizado o gene constitutivo HLA $\beta$  e como controle positivo da reação foi utilizado a amostra HeLa, conhecidamente positiva para o HPV. Apesar de ter sido detectada a amplificação dos primers na amostra HeLa, não foi observada neste primeiro *round* de PCR nenhuma amostra de CCEO positiva para o HPV. Além disso, podemos visualizar que o gene constitutivo (HLA $\beta$ ) foi observado em todas as amostras, exceto a CCEO14 que possivelmente seu DNA não estava íntegro e não foi possível a amplificação da PCR (**Figura 10**).

**Figura 10:** Fotografia de uma corrida eletroforética de *Nested PCR* para o pool de *primers* PGMY09, PGMY11 e gene constitutivo HLA $\beta$ .

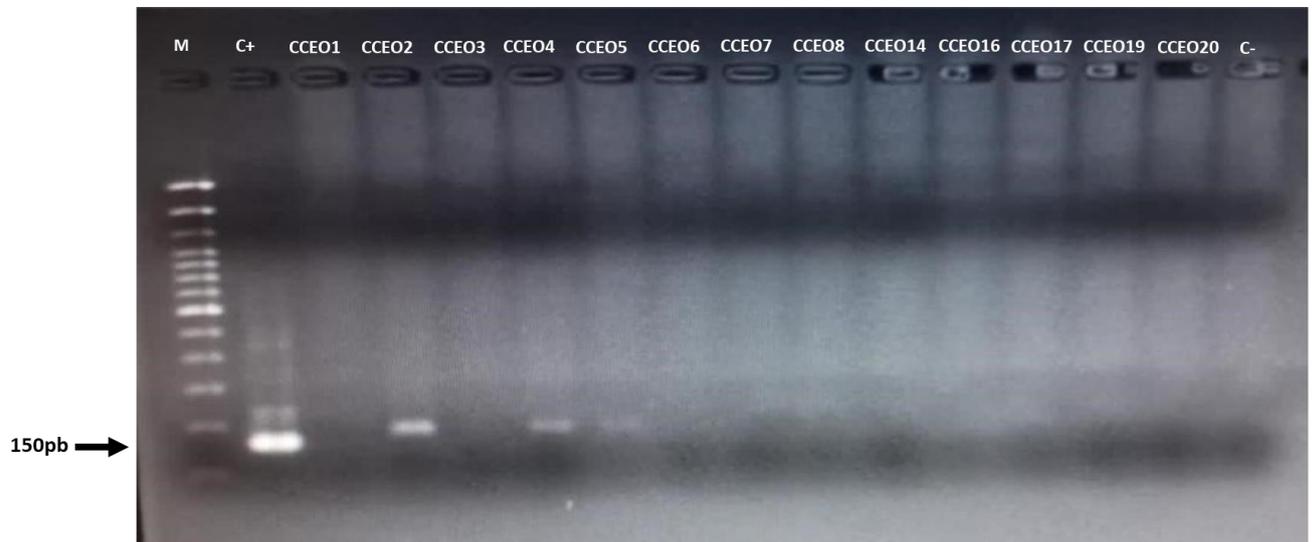


Legenda: No gel de agarose a 2%, as observações incluíram: na primeira coluna, o marcador de peso molecular (M – 100pb, pares de base), controle positivo (Hela), portadores de CCEO e controle negativo, respectivamente. A amostra que exibiu fragmentos de 400 e 190pb foi identificada como positiva para o vírus do papiloma humano (HPV). Todas as amostras, com exceção da CCE14, apresentaram amplificação para o gene constitutivo (HLA $\beta$ ).

Ao realizarmos a amplificação das amostras utilizando os primers GP5+/GP6+, foi constatado que três das amostras (CCEO2, CCEO4 e CCEO5) apresentaram

resultados positivos indicando a presença do HPV (**Figura 11**).

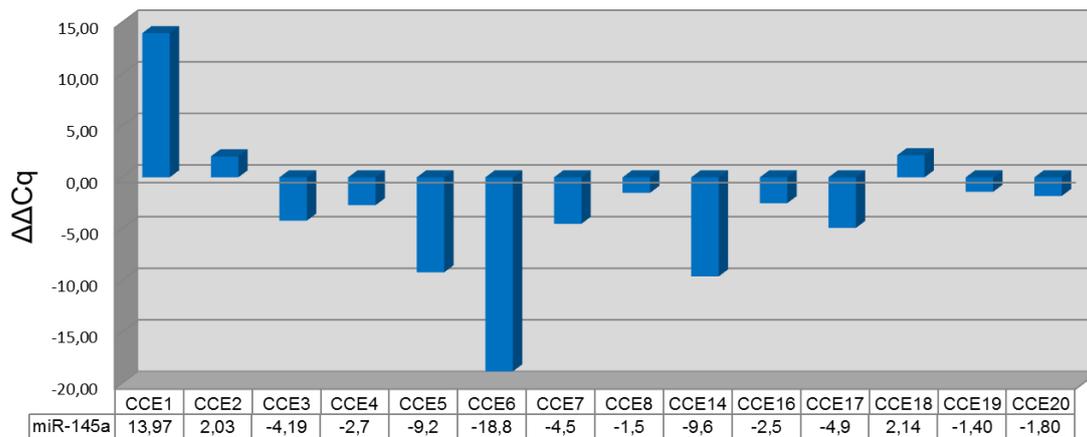
**Figura 11:** Fotografia de uma corrida eletroforética da PCR para o *primers* GP5+/GP6+.



Legenda: N No gel de agarose a 2%, as observações incluíram: na primeira coluna, o marcador de peso molecular (M – 100pb, pares de base), controle positivo (Hela), portadores de CCEO e controle negativo, respectivamente. As amostras que exibiram fragmentos 150pb foi identificada como positiva para o vírus do papiloma humano (HPV).

### 5.3. Avaliação da expressão de mir-145 nas amostras de CCEO por PCR quantitativa (qPCR)

Logo após, procedemos com a avaliação de miR-145a por qPCR nas 18 amostras de CCEO em comparação com 10 amostras de mucosa oral saudável. Infelizmente, apenas 14 amostras apresentaram amplificação para este miRNA. Cerca de 78,5% das amostras mostraram-se com expressão reduzida, porém, de acordo com o corte de +2 e -2 adotado neste estudo levando em conta o método de  $2^{-\Delta\Delta C}$  para se considerar diferença de expressão, um pouco mais da metade dos pacientes (8/57,14%) apresentaram hipoexpressão para miR-145a, 3 (21,5%) apresentaram hiperexpressão e em 3 (21,5%) pacientes não foi verificada diferença de expressão para esse paciente (**Figura 12**).

**Figura 12:** Expressão de miR-145a em amostras de CCEO

**Legenda:** Avaliação da expressão de miR-145a em amostras de 14 pacientes portadores de CCEO comparadas com 10 amostras de pacientes portadores de mucosa oral saudável. As amostras foram corridas em triplicata e na presença de um controle negativo. RNU48 foi utilizado como controle endógeno.

#### 5.4. Associação entre a presença de HPV, a expressão de miR-145, dados demográficos e clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEO

Infelizmente não foi possível avaliar a associação entre a presença do HPV, a expressão de miR-145a nas amostras de CCEO, os dados demográficos e clinicopatológicos em virtude do pequeno número de amostras analisadas nesse estudo. Entretanto, quando observamos as três amostras que foram positivas para a presença de HPV, verificamos que em duas delas (CCE4 e CCE5) miR-145a encontrava-se hipoexpresso. Com relação aos dados demográficos 2 dos três pacientes eram do sexo feminino e apresentavam mais de 70 anos. Além nessas duas pacientes o sítio anatômico acometido foi a borda lateral de língua (Tabela X).

**Tabela 2** - Dados demográficos e clinicopatológicos dos pacientes portadores de CCEO e correlação com expressão de miR-145a

Amostra	Localização	Tabaco	Álcool	Gênero	Idade (anos)	Diferenciação histológica	Presença do HPV	Expressão de miR-145a
C CEO1	AB	S	S	M	67	MD	-	13,97
C CEO2	AB	S	S	M	73	MD	+	2,03
C CEO3	L-CO	N	N	M	69	MD	-	-4,19
C CEO4	L-CO	N	S	F	81	BD	+	-2,70
C CEO5	L-CO	N	N	F	70	MD	+	-9,20
C CEO6	RA	N	N	M	89	MD	-	-18,80
C CEO7	AB	N	S	M	81	PD	-	-4,50
C CEO8	L-CO	S	S	M	67	MD	-	-1,50
C CEO14	L-CO	N	N	F	86	MD	-	-9,60
C CEO16	L-CO	S	S	M	62	MD	-	-2,50
C CEO17	L-CO	S	S	M	84	MD	-	-4,90
C CEO18	AB	N	S	M	51	MD	-	2,14
C CEO19	AB	S	S	M	53	MD	-	-1,40
C CEO20	L-CO	N	S	M	70	MD	-	-1,80

**Legenda:** CCEO, paciente portador de Carcinoma de Células Escamosas Oral; Localizações: L-CO, língua-cavidade oral; AB, assoalho de boca; ORO, orofaringe; FV, fundo de véstíbulo; GEN, gengiva; RA, rebordo alveolar. Diferenciação: BD, bem-diferenciado; MD, moderadamenediferenciado; PD, pouco diferenciado.

## 7. DISCUSSÃO

Este presente estudo teve por objetivo avaliar a influência do HPV na expressão de miR-145a. Das 14 amostras avaliadas, apenas três mostraram a presença do HPV pela metodologia de *Nested* PCR proposta por Gravitt *et al.* (2000) e Venceslau *et al.* (2014). Nesse método um conjunto de primers são destinados à amplificação dos seguintes genótipos de HPV: HPV 6,11,16,18,26,31,33,35,40,45,51,52,56 e 59.

Awan *et al.* (2017), tiveram como objetivo a comparação e análise da PCR e IHC quanto à sua sensibilidade para detectar HPV em CCEO. Sendo assim, foram coletadas 47 amostras de pacientes com CCEO primário. Os critérios de inclusão foram dados clínico-patológicos completos, acompanhamento clínico adequado e disponibilidade de material tumoral embebido em parafina. Os HPV gerais e dos tipos específicos, 16 e 18 foram investigados por meio de PCR. Posteriormente, por meio de imunohistoquímica a imunorreatividade para o HPV foi investigada. A presença de HPV foi detectada por PCR em 32 pacientes, enquanto a imunohistoquímica (IHQ) não apresentou resultados positivos. Já o p53 foi positivo em 32 pacientes e negativo em 15. O HPV 16 foi mais prevalente, apresentando positividade em 27 pacientes, enquanto o HPV18 foi positivo em apenas 1. Deste modo, os autores sugerem que a PCR é um método mais sensível e confiável para o diagnóstico de HPV para CCEO comparada à IHQ, uma vez que os resultados gerados por esse método foram negativos e insignificantes. Portanto, os autores recomendam que a PCR deve ser o primeiro teste diagnóstico inicial para detecção de HPV devido à sua melhor sensibilidade e sucesso.

Thammaiah *et. al.* (2018) avaliaram a presença do HPV 16 através da pesquisa das oncoproteínas E6 e E7 no CCEO pela técnica de qPCR. Foram utilizadas 97 amostras, obtidas de pacientes com CCEO confirmados histopatologicamente. A classificação histopatológica pouco diferenciado, moderadamente diferenciado e bem diferenciado foi utilizada seguindo os critérios da OMS para CCEO. A presença de infecção por HPV foi detectada pela expressão de p16 INK4A, pela técnica de PCR convencional, pela identificação das oncoproteínas E6 e E7 do HPV 16 por qPCR, e por citometria de fluxo. Das 297 amostras, 128 amostras foram consideradas HPV positivas em relação ao p16. A técnica de qPCR foi considerada altamente significativas na detecção do HPV nos casos de CCEO moderados ( $P < 0,0001$ ) e no CCEOs bem diferenciados ( $P < 0,0001$ ). A positividade de E6 por qPCR aumentou à medida que a expressão de p16 aumentou. Afirmando-se deste modo que a detecção

qPCR da infecção por HPV é uma técnica rápida, confiável, precisa e que fornece informações valiosas sobre o estado da infecção em termos de carga viral.

Tokuzen *et al.* (2021), tiveram como objetivo esclarecer a associação entre a infecção pelo HPV, a expressão da proteína p16 e as características clinicopatológicas do CCEO. Foram investigadas 100 amostras de CCEO por qPCR e coloração imuno-histoquímica. A expressão do gene E6 do HPV-16 foi detectado em apenas uma amostra e a expressão positiva de p16 em 10 amostras, incluindo a amostra HPV+. Posteriormente, a associação entre o nível de expressão de p16 e fatores característicos clinicopatológicos foram analisados. Porém, nenhuma associação significativa foi encontrada. O que sugere que a infecção por HPV-16 tinha menos probabilidade de causar CCEO e que a expressão de p16 não é um marcador adequado para infecção por HPV em CCEO.

Baddevithana *et al.* (2023), tiveram como objetivo principal identificar uma relação entre HPV e p16 em condições orais potencialmente malignas (COPM's) e compará-las com o CCEO. Foram estudados 83 casos de CCEO's e COPM's. A presença do HPV e a expressão de p16 foram avaliadas por PCR. Assim como o presente estudo, estes autores demonstraram que as amostras de CCEO apresentaram baixa prevalência para a presença do HPV. Como resultado para p16 as DOPM's expressaram uma quantidade significativa deste gene quando comparados às lesões malignas. Essa possível inativação do gene p16 em lesões malignas e hiperexpressão nas COMP's pode ser independente da presença do HPV, estando em concordância com o estudo citado anteriormente de Tokuzen *et al.* (2021).

Contrariando os artigos supracitados, para investigar a associação entre os genótipos 16/18 do HPV em pacientes paquistaneses com CCEO, Zil-E-Rubab *et al.* (2018), coletaram 300 amostras de pacientes e extraíram o DNA dessas amostras. Foram incluídas amostras de 100 pacientes CCEO e 200 amostras controle. As amostras foram analisadas por PCR convencional e PCR em tempo real. Foram utilizados os primers Gp5+/Gp6+ e primers específicos para HPV 16 e 18. Das 300 amostras estudadas, 74 estavam infectadas pelo HPV's, um percentual muito parecido com o encontrado em nosso estudo. Dos 300 indivíduos, 26 (35%) foram infectados por ambos os tipos de HPV (HPV16 e HPV18).

Naz *et al.* (2022) realizaram um estudo com 800 casos de CCEO na Índia, onde acreditava-se que o HPV teria um papel importante no desenvolvimento do CCEO. Os

pacientes receberam um questionário contendo perguntas relacionadas com dados sociodemográficos e hábitos. As amostras foram processadas para imunohistoquímica para p16. Os casos com coloração nuclear positiva, foram posteriormente submetidos a PCR para detecção do DNA do HPV. Dos 800 casos de CCEO, 139 apresentaram imunopositividade para p16. Destes, 104 (11,55%) casos foram positivos para o HPV. Um percentual menor comparado a este presente estudo. Nenhuma correlação a uma maior proporção de positividade para p16 e DNA do HPV foi observada com sexo, tabagismo ou hábitos de mastigação, religião, ocupação ou localização do tumor. A imunopositividade p16 foi maior na faixa etária mais jovem e sem hábitos de tabagismo. Sendo assim, podemos sugerir que o HPV pode ser o principal fator etiológico.

Petrović *et al.* (2023) avaliaram 90 pacientes distribuídos em 3 grupos distintos contendo 30 participantes cada: (grupo 1) pacientes com CCEO, (grupo 2) pacientes com condições orais potencialmente malignas e (grupo 3) indivíduos saudáveis. No material obtido por meio de esfregaços orais, foi pesquisada por PCR em tempo real a presença de 12 genótipos de HPV. Como resultados, os autores demonstraram que um ou mais dos 12 genótipos de HPV testados foram detectados em 5/30 (16,6%) pacientes com CCEO e 2/30 (6,66%) com doenças orais potencialmente malignas, enquanto nenhum indivíduo saudável foi positivo para qualquer um dos genótipos testados. Conclui-se então que o HPV foi detectado em pacientes com lesões orais pré-malignas e malignas, mas não em indivíduos saudáveis, sugerindo um possível papel na carcinogênese oral.

Nosso passo seguinte foi avaliar a expressão de miR-145a em amostras de CCEO. Identificamos a hipoexpressão desse miRNA em um pouco mais da metade dos pacientes (57,14%). Segundo o estudo promovido por Gao *et al.* (2013), foi investigada a expressão do miR-145 no CCEO com seu significado clínico, através de 62 amostras de tecido de CCEO por qRT-PCR. E posteriormente avaliada a relação entre a expressão do miR-145 e os fatores clinicopatológicos desses pacientes. As proporções de baixa expressão do miR-145 foi de 82,26%, sendo 51/62. Entre os 62 pacientes estudados com CCEO, os níveis de expressão do miR-145 foram significativamente menores dos que faziam parte do grupo controle, concluindo-se que o miR-145 pode estar envolvido na tumorigênese precoce de células no CCEO e podendo ser um potencial biomarcador no diagnóstico precoce.

Corroborando com Gao *et al.* (2013), Shao *et al.* (2013), determinaram em seu estudo também os níveis de expressão do miR-145 em CCEO's e tecidos normais da mucosa oral, além de observar sua função. A mesma metodologia foi utilizada, obtendo-se a mesma conclusão de que o miR-145 exercia função supressora de tumor o que aponta que miR-145 possui potencial para ser utilizado para aplicações diagnósticas e terapêuticas no CCEO.

Ding *et al.* (2019), estudaram 48 pacientes com diagnóstico de CCEO dos quais foram removidas as amostras dos tecidos de CCEO e dos tecidos normais, que foram adjacentes. Para avaliar os efeitos do miR-145 no CCEO e o mecanismo regulatório, foi adotada a linhagem celular SCC-9 (linhagem celular de CCE de língua), na qual a expressão do miR-145 e HOXA1 foi alterada por transfecção. Em seguida, uma série de experimentos *in vitro* e *in vivo* foram realizados para avaliar a viabilidade celular, migração, invasão e crescimento tumoral. Nos resultados referentes ao miR-145, com sua ação aumentada, a linhagem celular SCC-9 manifestou-se com viabilidade celular inibida, invasão e migração *in vitro*, juntamente com crescimento tumoral reduzido *in vivo*. Sugerindo-se desta forma que o miR-145 pode inibir o HOXA1, inativando a via de sinalização ERK / MAPK, suprimindo assim a proliferação, migração e invasão de células do CCEO e conseqüentemente inibindo o seu desenvolvimento, o que sugere que miR-145 pode se tornar um novo alvo terapêutico no tratamento do CCEO.

Em concordância com artigos supracitados e mais recente da literatura, Singh *et al.* (2023), com um estudo observacional prospectivo avaliaram 50 amostras de pacientes portadores de CCEO e 20 de mucosa oral normal. Após pesquisada histologia detalhada, o perfil do miRNA-145 foi realizado usando qRT-PCR. A média de idade dos pacientes com câncer bucal das amostras coletadas foi de 47,5 ( $\pm$  10,25 anos). A expressão dos níveis médios de miR-145 em CCEO foram de  $0,4312 \pm 0,32026$  e a média do grupo controle foi de  $0,99 \pm 0,21771$ . Observou-se uma regulação negativa, bastante significativa do miRNA-145 nas amostras de CCEO, em relação também ao tamanho do tumor, estado nodal e estadiamento clínico tumoral. Estes estudos demonstram, portanto, que níveis reduzidos de miRNA-145 em amostras de CCEO acarretam um mau prognóstico.

Uma análise comparativa entre os três pacientes que eram portadores de HPV apresentaram miR-145. Sendo 1 paciente do sexo masculino apresentando de forma expressa o miR-145 (2,03) e as outras duas do sexo feminino de forma hipoexpressa (-2,70; -9,20).

## 8.CONCLUSÃO

Diante do exposto com esse trabalho concluímos que:

- Corroborando com a pouca literatura existente, a maioria de nossas amostras foram obtidas de pacientes do sexo masculino (66,66%) e com mais de 60 anos (83,33%). Quase a metade se declararam fumantes (47,36%) e mais da metade etilistas. A localização anatômica da região oral mais acometida pelo CCE, foi a língua (44,44%)
- Não foi possível identificar o vírus do HPV na primeira corrida eletroforética com o pool de primers PGMY09 e 11, para 450pb. Já na amplificação utilizando os primers GP5+ e GP6+, 3 amostras positivas para o vírus HPV foram identificadas (CCE02, CCE04 e CCE05).
- Quanto à expressão do miR-145, quase em 80% das amostras, estava de forma hipoexpressa. 3 amostras estava hiperexpresso e em 3 não foi vista diferença.
- Dos pacientes positivos para HPV, 2 são do sexo feminino e 1 do sexo masculino. Sendo visualizada a hipoexpressão do miR-145 nas 2 primeiras.
- Devido ao nosso baixo número amostral, não conseguimos relacionar a expressão do miR-145 à positividade do HPV em casos de CCEO.
- Esse tema necessita de mais estudos para comprovar ou não está relação.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKYUZ, S.N.; ERDEMIR, A. Restoration of tooth fractures using fiber post and fragment reattachment: three case reports. **Eur J Gen Dent.**, Kirikkale, v.1, n.1, p.94-8, jun. 2012.

ATTY, A.T.M.; JARDIM B.C.; DIAS M.B.K.; MIGOWSKI A.; TOMAZELLI J.G.; PAINEL-ONCOLOGIA: uma Ferramenta de Gestão. **Rev Bra Can.**, v.66, n.2. 2020.

ARTAVANIS T.S.; RAND M.D.; LAKE R.J.; Notch signaling: Control of cellular fate and integration of signals in development. **Science.**; v.284, p.770-776. 1999.

AWAN, MS.; IRFAN, B.; ZAHID, I.; MIRZA, Y.; ALI, SA.; Comparison of Polymerase Chain Reaction and Immunohistochemistry Assays for Analysing Human Papillomavirus Infection in Oral Squamous Cell Carcinoma. **J Clin Diagn Res.** 2017 Jun;11(6):XC10-XC13. doi: 10.7860/JCDR/2017/24742.10119. Epub 2017 Jun 1. PMID: 28764278; PMCID: PMC5535468.

BADDEVITHANA, AK.; JAYASINGHE, RD.; TILAKARATNE, WM.; ILLEPERUMA, RP.; SIRIWARDENA, BSMS.; Expression of Human Papillomavirus and the p16 Gene in Oral Potentially Malignant Disorders (OPMD): a Comparative Study With Oral Squamous Cell Carcinoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** 2023 May-Jun 01;31(5):331-338. doi: 10.1097/PAI.0000000000001124. Epub 2023 Apr 11. PMID: 37036407.

BANO N.; YADAY M.; MOHANIA D.; DAS B.C.; The role of NF- $\kappa$ B and miRNA in oral cancer and cancer stem cells with or without HPV16 infection. **PLoS One**, v.13, n.10, Out. 2018.

BARNES, L., EVESON, J., REICHART, P., & SIDRANSKY, D.. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours (2005).

BRAVO I.G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ M.; Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evol Med Public Health.** 2015 Jan 28; 2015(1):32-51. doi: 10.1093/emph/eov003. PMID: 25634317; PMCID: PMC4356112.

BERNARD C.; ZHANG J.Z.; KLIEB H.; BLANAS N.; XU W.; MAGALHAES M.; Clinical outcomes of oral epithelial dysplasia managed by observation versus excision. **Head Neck.** 2023 Dec;45(12):3096-3106. doi: 10.1002/hed.27539. Epub 2023 Oct 6. PMID: 37800675.

BERNARD H.U.; BURK R.D.; CHEN Z.; VAN D.K.; HAUSEN H.; VILLIERS E.M.; Classification of papillomavirus (PVs) based on 189 types of PV and proposed taxonomic changes. **Virology**, v.401, p.70-79. 2010.

BEYNON R.A.; LANG S.; SCHIMANSKY S.; PENFOLD C.M.; WAYLEN A.; THOMAS S.J.; PAWLITA M.; WATERBOER T.; MATIN R.M., MAY M.; NESS A.R.; Tobacco smoking and alcohol drinking at diagnosis of head and neck cancer and all-cause mortality: Results from head and neck 5000, a prospective observational cohort of people with head and neck cancer. **Int J Cancer**. 2018 Sep 1;143(5):1114-1127. doi: 10.1002/ijc.31416. Epub 2018 Apr 23. PMID: 29607493; PMCID: PMC6099366.

BOZINOVIC K.; SABOL I.; DEDIOL E., *et al.*; The miRNA profile of the entire genome reinforces the importance of miR-9 in head and neck cancer associated with human and oropharyngeal papillomavirus. **Science**, v.2306. 2019.

CHATTOPADHYAY I.; Verma M.; Panda M.; Role of Oral Microbiome Signatures in Diagnosis and Prognosis of Oral Cancer. **Technol Cancer Res Treat**, v.18. 2019.

CUBIE H.A.; Diseases associated with human papillomavirus infection. **Virology**, v.445, p221-234. 2013.

DANTAS T.S.; BARROS S.P.G.; LIMA V.M.E.Q.; RIBEIRO J.A.L.; CUNHA M.D.P.S.S.; MOTA M.R.L.; ALVES A.P.N.N.; LEITÃO R.F.C.; SOUZA F.B.; role of Inflammatory Markers in the Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Asian Pac J Cancer Prev**, v.20, n. 12, p.3635-3642, Dez. 2019.

DING J.; SUN D.; XIE P.; Elevated microRNA-145 inhibits the development of oral squamous cell carcinoma through inactivating ERK/MAPK signaling pathway by down-regulating HOXA1. **Biosci Rep**. 2019 Jun 25;39(6): BSR20182214. doi: 10.1042/BSR20182214. Retraction in: **Biosci Rep**. 2022 Nov 30;42(11): PMID: 31138758; PMCID: PMC6591566.

DHANUTHAI K.; ROJANAWATSIRIVEJ S.; THOSAPORN W.; *et al.*; Oral cancer: a multicenter study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.23, n.1, p.23-29, Jan. 2018.

GAO L.; REN W.; CHANG S.; GUO B.; HUANG S.; LI M.; GUO Y.; LI Z.; SONG T.; ZHI K.; HUANG C.; Downregulation of miR-145 expression in oral squamous cell carcinomas and its clinical significance. **Onkologie**. 2013;36(4):194-9. doi: 10.1159/000349956. Epub 2013 Mar 18. PMID: 23548968.

GHALWASH D.M.; Diagnostic and prognostic value of salivary biomarkers in oral cancer and precancer: Review article. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**. 2020.

GHANTOUS Y.; ABU ELNAAJ I.; [GLOBAL INCIDENCE AND RISK FACTORS OF ORAL CANCER]. **Harefuah**. 2017 Oct;156(10):645-649. Hebrew. PMID: 29072384.

GOLABEK K.; HUDY D.; ŚWIETEK A.; GAZDZICKA J.; DABROWSKA N.; MISKIEWIC-ORCZYK K.; ZIEBA N.; MISIOLEK M.; STRZEICZYK J.K.; miR-125b-5p, miR-155-3p, and miR-214-5p and Target *E2F2* Gene in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Int J Mol Sci.** 2023 Mar 28;24(7):6320. doi: 10.3390/ijms24076320. PMID: 37047293; PMCID: PMC10094498.

HARDEN M.E.; KARLMUNGER K.; Molecular biology of human papillomavirus. **Res Rev Mutat**, v.772, p.3-12. 2017.

HEAWCHAIYAPHUM C.; EKALAKSANANAN T.; PATARAPADUNGKIT N.; WORAWICHAWONG S.; PIEN TONG C.; Epstein-Barr Virus Infection Alone or Jointly with Human Papillomavirus Associates with Down-Regulation of miR-145 in Oral Squamous-Cell Carcinoma. **Microorganisms.** 2021 Dec 2;9(12):2496. doi: 10.3390/microorganisms9122496. PMID: 34946098; PMCID: PMC8708579.

ION F.I.; MARASESCU P.C.; MATEI M.; FLORESCU A.M.; MARGARITescu C.; PETRESCU S.M.S.; DUMITRESCU C.I.; Epidemiological and Histopathological Aspects of Tongue Squamous Cell Carcinomas-Retrospective Study. **Cur Health Sci J**, v.44, n.3, p. 211-224, Jul/Sep. 2018

FERLAY J.; SOERJOMATARAM I.; DIKSHIT R.; ESER S.; MATHERS C.; REBELO M.; PARKIN DM.; FFORMAN D.; BRAY F; Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v.1;136, n.5, p. E-359-86, Mar.2015

LECHIEN J.R.; SEMINERIO I. ; DESCAMPS G. ; *et al* ; Impact of HPV Infection on the Immune System in Oropharyngeal and Non-Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. **Cells**, v.9, n.9, p.1061. Sep. 2019.

LONGWORTH M.S.; LAIMINS L.A.; Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.68, n.2, p.362-72. jun. 2004.

MANDASARI M.; SAWANGARUN W.; KATSUBE K.; KAYAMORI K.; YAMAGUCHI A.; SAKAMOTO K; A simple one-step strategy for the generation of conditional knockout mice to explore the role of Notch1 in oroesophageal tumorigenesis. **Biochem. Biophys. Res. Comum**, v.469, p.761-767. 2016.

MANSUR, C.P. Molecular mechanisms of HPV-associated oncogenesis. In STERLING J.C. & TYING, S.K. (org.) **Human papillomaviruses – clinical and scientific advances, Londres, Arnold, 2001.**

MELOTY-KAPPELLA L.; SHERGILL B.; KUON J.; BOTVINICK E.; WEINMASTER G; Endocytosis of the Notch ligand generates mechanical traction force dependent on dinamine, epsins and actin. **Dev. Célula**, v.22, p.1299–1312. 2012.

MEHANNA H.; BEECH T.; NICHOLSON T.; *et al*; Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. **Head Neck**, v.35, n.5, p.747-755. 2013

**Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer** - Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>

**Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer** - Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2023.pdf>

MUÑOZ N.; CASTELLSAGUÉ X.; GONZAIÉZ A.B.; GISSMAN L; Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. **Vac**, v.24, n.3. 2006.

NAZ, F.; VERMA, H.; TANVEER, N.; SUDHEER, AK.; KAKKAR, A.; TANWAR, P.; Demographic Profile of p16 Immunopositive and HPV DNA PCR Positive Oral Squamous Cell Carcinoma in a Large Cohort of Indian Patients. **Asian Pac J Cancer Prev**. 2022 Feb 1;23(2):529-536. doi: 10.31557/APJCP.2022.23.2.529. PMID: 35225465; PMCID: PMC9272603.

NED G. POWELL E MERERID EVANS; Human papillomavirus-associated head and neck cancer: oncogenic mechanisms, epidemiology and clinical behavior; **Diagnostic Histopathology**, v.21, n.2, p.49-64. 2015.

OZSOLAK F.; POLING L.; WANG Z.; LIU H.; LIU XS.; ROEDER R.G.; ZHANG X.; CANÇÃO J.S.; FISHER D.E.; Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. **Genes & Dev**. 2008; (22): 3172-3183.

PALVE V.; BAGWAN J.; KRISHNAN N.M.; *et al*. Detection of High-Risk Human Papillomavirus in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity Using Various Analytes and Their Role in Patient Survival. **J Glob Oncol**, n.4, p.1-33. 2018.

PETROVIC, A.; CANKOVIC, M.; AVRAMOV, M.; POPOVIC, ZD.; JANKOVIC, S.; Mojsilović S. High-Risk Human Papillomavirus in Patients with Oral Carcinoma and Oral

Potentially Malignant Disorders in Serbia-A Pilot Study. **Medicina (Kaunas)**. 2023 Oct 17;59(10):1843. doi: 10.3390/medicina59101843. PMID: 37893561; PMCID: PMC10608774.

SANTOS P.S; *et. al.* Analysis of the role of race/skin color in the prognosis of cancer of the oral cavity and oropharynx. **Journal of Dentistry & Public Health**, v.9, n.2, p.170-179, Jun. 2018.

Singh A, Khan DU, Singh P, Singh AK, Agarwal P. Prognostic utility of microRNA-145 and CD 133 in oral squamous cell carcinoma: A pilot study from Northern India. **J Oral Biol Craniofac Res**. 2023 Mar-Apr;13(2):92-95. doi: 10.1016/j.jobcr.2022.11.008. Epub 2022 Dec 2. PMID: 36536870; PMCID: PMC9758525.

SINGH, V.; HUSAIN, N.; AKHTAR, N.; KHAN, MY.; SONKAR, AA.; KUMAR, V.; p16 and p53 in HPV-positive versus HPV-negative oral squamous cell carcinoma: do pathways differ? **J Oral Pathol Med**. 2017 Oct;46(9):744-751. doi: 10.1111/jop.12562. Epub 2017 Mar 21. PMID: 28186650.

PELTANOVA B.; RAUDENSKA M.; MASARIK M; Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. **Mol Cancer**, v.18, n.1, p.63. 2019.

PEREIRA V.C E OLIVEIRA P.A.F; Definição das terapias celulares com receptores de antígenos quiméricos (CAR), receptores de células t (TCR) e linfócitos infiltrantes de tumor (TIL). Perspectivas futuras para a cura do câncer. **Brazilian Journals**, v.2, n.2. 2019.

PORCHERI C.; MEISEL C.T.; MITSIADIS T; Multifactorial Contribution of Notch Signaling in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; **Int J Mol Sci**, v.20, n.6, p.1520. 2019.

RIETBERGEN M.M.; BRAKENHOFF R.H.; BLOEMENA E.; WITTE B.I.; SNIJDERS P.J.; HEIDEMAN D.A.; BOON D.; KOLJENOVIC S.; BAATENBURG J.R.J, LEEMANS C.R; Detection and comorbidity of human papillomavirus: critical issues in the selection of patients with oropharyngeal cancer for treatment Decalcification assays. **Ann Oncol**, n.24, p.2740-2745. 2013.

SALLAM M. ; AL-FRAIHAT E. ; DABABSEH D ; *et al.* Dental students' awareness and attitudes towards HPV-related oral cancer: a cross-sectional study at the University of Jordan. **BMC Oral Health**, v.19, n.1, p.171, ago. 2019.

SANTOS H.B.; DOS SANTOS T.K.; PAZ A.R.; CAVALCANTI Y.W.; NONAKA C.F, GODOY G.P, ALVES P.M; Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma

in young patients: A 12-year retrospective analysis; **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.21, n.2, p.151-6, Mar. 2016.

SANTOS L.C.O.; BATISTA O.M.; CANGUSSU M.C.T. Characterization of oral cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. **Braz J Otorhinolaryngol**, v.76, n.4, p.416-22. 2010.

SCHIFFMAN M.H E BURK R.D. Human papillomaviruses. *Viral infections of humans. Epidemiology and control*, v.4. 1997.

SHAO Y.; QU Y.; DANG S.; YAO B.; JI M.; MiR-145 inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth by targeting c-Myc and Cdk6. **Cancer Cell Int**. 2013 May 28;13(1):51. doi: 10.1186/1475-2867-13-51. PMID: 23710609; PMCID: PMC3680295.

SPEIGHT P.M.; EPSTEIN J.; KUJAN O.; LINGEN M.W.; NAGAO T.; RANGANATHAN K.; VARGAS P.; Screening for oral cancer-a perspective from the Global Oral Cancer Forum. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2017 Jun;123(6):680-687. doi: 10.1016/j.oooo.2016.08.021. Epub 2016 Sep 9. PMID: 27727113.

SPPRIGS C.C.; LAIMINS L.A.; Human papillomavirus and DNA damage response: exploring host repair pathways for viral replication. **Virus**, n.9, n.8, p.232, Ago. 2017.

SYRJÄNEN S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. **Eur J Oral Sci.**, v.126, n.1, p. 49-66. 2018.

THAMMAIAH, S.; VENKOBARAO, MC.; SATHYAVANTHAN, H.; MIRNALINI, AS; Quantitative polymerase chain reaction-based detection of HPV 16 E6 and E7 DNA in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**. 2018 Oct;47(9):873-879. doi: 10.1111/jop.12770. Epub 2018 Aug 20. PMID: 30059164.

TOKUZEN, N.; NAKASHIRO, KI.; TOJO, S.; GODA, H.; KURIBAYASHI, N.; UCHIDA, D; Human papillomavirus-16 infection and p16 expression in oral squamous cell carcinoma. **Oncol Lett**. 2021 Jul;22(1):528. doi: 10.3892/ol.2021.12789. Epub 2021 May 14. PMID: 34055093; PMCID: PMC8138897.

VARELA-CENTELLES P.; LÓPEZCEDRÚM J.L.; FERNÁNDEZ-SANROMÁN J.; SEOANE-ROMERO J.M.; SANTOS DE MELO N.; ÁLVAREZ-NÓVOA P.; GÓMEZ I.; SEOANE J.; Key points and time intervals for early diagnosis in symptomatic oral cancer: a systematic review. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2017 Jan;46(1):1-10. doi: 10.1016/j.ijom.2016.09.017. Epub 2016 Oct 15. PMID: 27751768.

VERMA G. ; VISHNOI K. ; TYAGI A. ; *et al* ; Characterization of the main transcription factors as molecular signatures of HPV positive and HPV negative oral cancers. **Cancer Med**, v.6, n.3, p.591-604. 2017.

WANG H.K.; DUFFY A.A.; BROKER T.R.; CHOW L.T; Robust production and passage of infectious HPV in the squamous epithelium of primary human keratinocytes; **Genes**, v.23, p.181-194. 2009.

PO WING YUEN A; LAM K.Y; *et al*. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma-A comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimeno score, and pathologic features. **Head Neck**, v.24, n.6, p.513-520. 2002.

You EL, Henry M, Zeitouni AG. Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: review of current evidence and management. *Curr Oncol*. 2019 Apr;26(2):119-123. doi: 10.3747/co.26.4819. Epub 2019 Apr 1. PMID: 31043814; PMCID: PMC6476447.

WARBURTON A.; REDMOND C.J.; DOOLEY K.E.; FU H.; GILLISON M.L.; AKAGI K.; SYMER D.E.; ALADJEM M.I.; MCBRIDE A.A; HPV integration hijacks and multimerizes a cell intensifier to generate a viral cell super-intensifier that generates high viral oncogene expression. **PLoS Genet**, v.14. 2018.

WEBER A.M.; RYAN A.J; TM and ATR as therapeutic targets in cancer. **Pharmacol. Ther**; v.149, p.124-138. 2015.

WEBER M.; MOEBIUS P.; BÜTTNER-HEROLD M. *et al*. Macrophage polarisation changes within the time between diagnostic biopsy and tumour resection in oral squamous cell carcinomas—an immunohistochemical study. **Br J Cancer**, v.113, p. 510-519. 2015.

WOOLGAR J.A.; Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.42, n.3, p.229-239. 2006.

ZIL-E-RUBAB, BAIG, S.; ZAMAN, U.; LUCKY, MH; Human papilloma virus 16/18: Fabricator of trouble in oral squamous cell carcinoma. **Int J Infect Dis**. 2018 Apr; 69:115-119. doi: 10.1016/j.ijid.2018.02.003. Epub 2018 Feb 9. PMID: 29432879.

ZHANG T.H.; LIU H.C.; ZHU L.J.; CHU M.; LIANG YJ.; LIANG L.Z.; LIAO G.Q.; Activation of Notch signaling in human tongue carcinoma. **J. Oral Pathol. Med**, v.40, p.37-45. 2011.

XU W.X.; LIU Z.; DENG F.; WANG D.D.; LI X.W.; TIAN T.; ZHANG J.; TANG J.H; MiR 145: A potential biomarker of cancer migration and invasion. **Am J Transl Res**, v.11, n.11, p. 6739-6753. Nov. 2019.

## 10. ANEXOS

### ANEXO I - Anuência do Comitê de Ética e Pesquisa da UNIGRANRIO

UNIVERSIDADE DO GRANDE  
RIO PROFESSOR JOSÉ DE  
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da influência do HPV na expressão de miRNAs no carcinoma de células escamosas oral

**Pesquisador:** Cláudia Maria Pereira

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 43110714.5.0000.5283

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE UNIGRANRIO

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.024.804

**Data da Relatoria:** 15/04/2015

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa investigativa que tem por objetivo identificar a presença do HPV16 em amostras de carcinoma de células escamosas oral ( CCEO ) e avaliar a expressão dos miRNAs ( ácidos nucleicos ) envolvidos com a carcinogênese oral diante da presença do HPV. As amostras a serem utilizadas neste estudo serão provenientes de pacientes portadores de CCEO atendidos na Clínica de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da UNIGRANRIO. Também serão utilizadas 15 amostras de mucosa normal provenientes de pacientes que não apresentam nenhuma patologia prévia ou clinicamente diagnosticável em cavidade oral, submetidos a cirurgias pré-protéticas na Clínica de Periodontia da Faculdade de Odontologia da UNIGRANRIO.

##### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:** Identificar a presença do HPV-16 nas amostras de CCEO e avaliar a expressão de miRNAs relacionados com a carcinogênese oral em amostras CCEO HPV positivas

**Objetivo Secundário:** Avaliar o nível de expressão das proteínas que são alvos do HPV e de miRNAs e que estão relacionadas com a carcinogênese oral.

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Relacionados a qualquer procedimento cirúrgico em odontologia.

**Endereço:** Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160  
**Bairro:** 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202  
**UF:** RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS  
**Telefone:** (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE  
RIO PROFESSOR JOSÉ DE  
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.024.804

**Benefícios:** Obtenção de diagnóstico precoce de doença oral e com consequente tratamento na clínica de odontologia e ou encaminhamento a outras.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante e considero importante sua aprovação.

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

Estão presentes a carta de anuência da Instituição, termo de consentimento livre e esclarecido e cronograma, todos os termos estão de acordo com as normas regulamentadoras em vigência ( CNS/MS - Resolução 466/12 ).

**Recomendações:**

Recomendamos a socialização dos resultados para a comunidade em geral.

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

Sou pela aprovação do projeto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Prezada Pesquisadora,

O Comitê de ética em Pesquisa da Unigranrio atendendo o previsto na Resolução nº 466/12 do CNS/MS aprovou o referido projeto na reunião ocorrida em 15 de abril de 2015. Caso o (a) pesquisador (a) altere a pesquisa é necessário que o projeto retorne ao Sistema Plataforma Brasil para uma futura avaliação e emissão de novo parecer. Lembramos que o (a) pesquisador (a) deverá encaminhar o relatório da pesquisa após a sua conclusão, como um compromisso junto a esta Instituição e o sistema da Plataforma Brasil.

Cordialmente,

CEP/UNIGRANRIO.

**Endereço:** Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160  
**Bairro:** 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202  
**UF:** RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS  
**Telefone:** (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

UNIVERSIDADE DO GRANDE  
RIO PROFESSOR JOSÉ DE  
SOUZA HERDY - UNIGRANRIO



Continuação do Parecer: 1.024.804

DUQUE DE CAXIAS, 15 de Abril de 2015

---

**Assinado por:**  
**Renato Cerqueira Zambrotti**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160  
**Bairro:** 25 de Agosto **CEP:** 25.071-202  
**UF:** RJ **Município:** DUQUE DE CAXIAS  
**Telefone:** (21)2672-7733 **Fax:** (21)2672-7733 **E-mail:** cep@unigranrio.com.br

## ANEXO 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa "Avaliação da influência do HPV na expressão de miRNAs no carcinoma de células escamosas oral". Você foi selecionado durante o exame clínico nas clínicas de Estomatologia e de Periodontia da UNIGRANRIO e a sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição.

Os objetivos deste estudo são a identificação da presença do papilomavírus humano (HPV) e de moléculas que se apresentam alterados nos cânceres de cavidade oral em comparação com a mucosa normal. Sua participação nesta pesquisa consistirá no fornecimento de um pequeno fragmento da mucosa da boca retirada durante o diagnóstico diferencial na clínica de Estomatologia ou com finalidade pré-protética na Clínica de Periodontia. Os riscos relacionados com sua participação seriam aqueles relacionados ao procedimento cirúrgico. Uma vez que tais procedimentos cirúrgicos já estão muito bem estabelecidos na rotina odontológica e que a remoção da mucosa consistirá apenas em uma pequena quantidade amostra, estes riscos tornam-se bastante reduzidos. Os benefícios relacionados com a sua participação consistirá no diagnóstico obtido pelo exame clínico e histopatológico da mucosa oral, da condição de normalidade ou de alteração. Caso seja verificada esta última condição, você receberá informações à respeito de tal alteração e tratamento adequado; ou será encaminhado para uma instituição que seja capacitada para tal atendimento.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar a sua identificação. Os dados referentes ao seu nome servirão apenas para a identificação de sua amostra e serão mantidos em sigilo pelo coordenador da pesquisa e em hipótese alguma, serão divulgados.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis Cláudia Maria Pereira (coordenadora) e Carina Maciel da Silva Boghossian e dos alunos Carlos Alberto Barros dos Santos, Andressa Raquel Alves Pinheiro e Luana Martins Barbosa de Lima, no e-mail claudemarie\_br@yahoo.com.br ou no telefone (021)-2672-7877

  
Resquisador Responsável

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na Rua Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733 – ENDEREÇO ELETRÔNICO: [cep@unigranrio.com.br](mailto:cep@unigranrio.com.br)

Rio de Janeiro, \_\_\_\_ de \_\_\_\_ de 20\_\_.

\_\_\_\_\_  
Sujeito da pesquisa

\_\_\_\_\_  
Pai / Mãe ou Responsável Legal