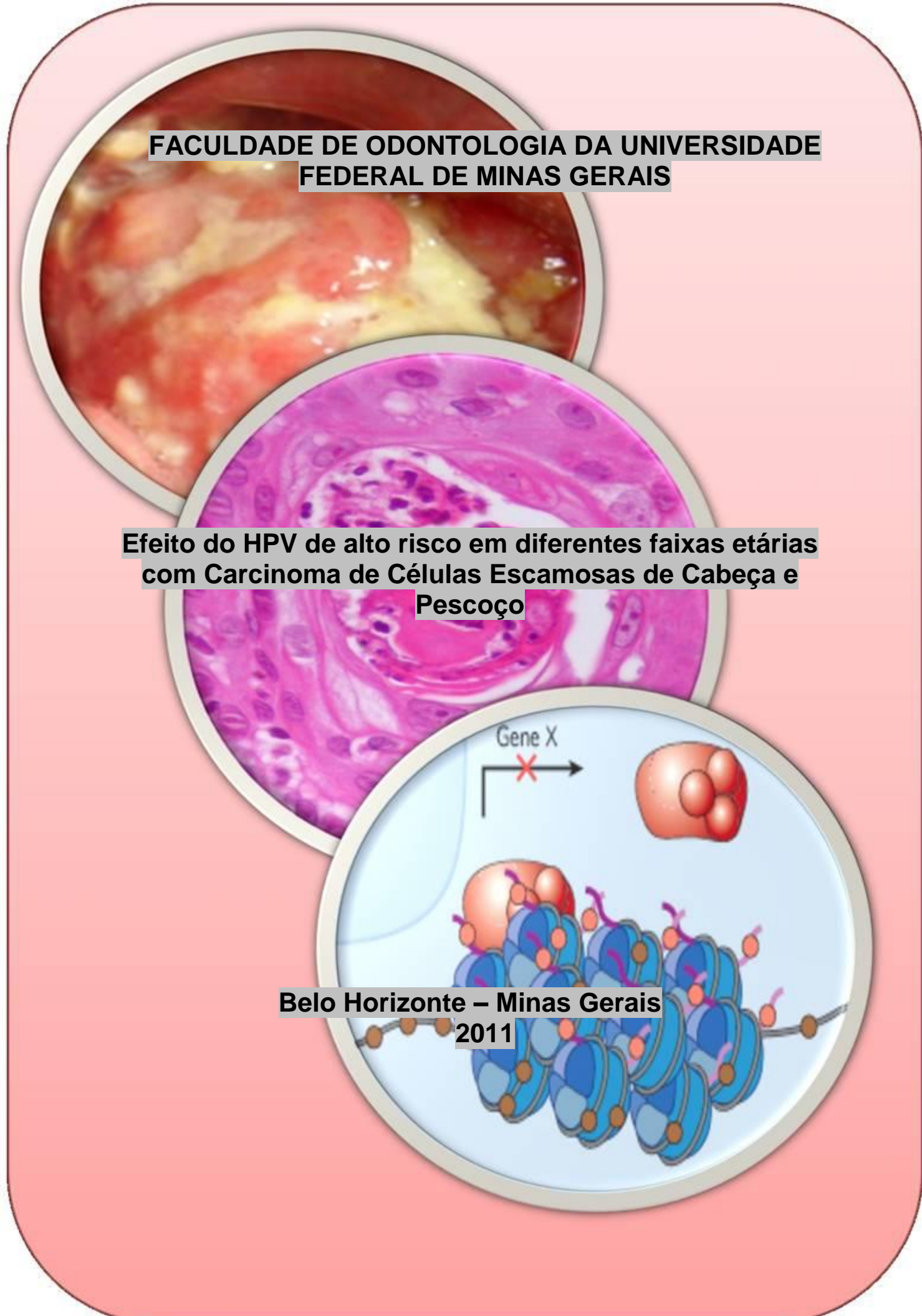


**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE
FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Efeito do HPV de alto risco em diferentes faixas etárias
com Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e
Pescoço**

**Belo Horizonte – Minas Gerais
2011**



LUCIANO MARQUES DA SILVA

**Efeito do HPV de alto risco em diferentes faixas etárias
com Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e
Pescoço**

Tese de Doutorado apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia, Área de Concentração Estomatologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia, Área de Concentração: Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Co-orientador: Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães

BELO HORIZONTE

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS

2011

Dedico este trabalho à minha família pelo amor e incentivo incondicional em todos os momentos dessa trajetória.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde, proteção e iluminação.

À minha mãe, exemplo de garra e perseverança, pela referência de vida e por estar sempre apoiando e acreditando em mim (sem você nada seria possível).

Ao meu pai, exemplo de tranquilidade e humildade, por toda convivência equilibrada e suporte necessário.

À minha esposa Karine pela compreensão, incentivo e amor demonstrado e compartilhado diariamente.

À Alice, minha filha, que é a mais nova razão do meu viver.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez por todo apoio, amizade, serenidade e pelo exemplo profissional (orgulho eterno de ser um dos seus orientados).

Ao meu co-orientador Prof. Dr. André Luiz Sena Guimarães por constantes auxílios, prestatividade e objetividade.

Aos meus irmãos Dado e Luiz Sérgio e demais familiares por todo o carinho.

Aos meus amigos de Pedro Leopoldo: Rodrigo, Roberta, Frederico e Bruno.

Aos professores do Departamento de Patologia e Cirurgia da referida instituição Prof. Dr. Wagner Castro, Prof. Dr. Ricardo Mesquita, Prof^a. Dra. Tarcília, Prof^a. Dra. Maria Cássia e Prof^a. Dra. Maria Auxiliadora pela oportunidade de trabalho e conhecimentos passados.

Ao Prof. Dr. Ricardo Rodrigues Vaz por ter aberto a primeira porta nesta faculdade para mim.

À Universidade Estadual de Montes Claros e seus professores por ter gentilmente nos cedido amostras e dados preciosos do arquivo de carcinoma da referida instituição.

Aos amigos do laboratório de biologia molecular Paula Rocha, Carolina Cavaliere, Lucyana, João Artur, Jeane, Fabrício, Marina, Claudia, Ana Carolina, Marcelo, Fabiano, Leandro Napier, Telma, Renata e Daniela.

A todos os outros Professores da Faculdade de Odontologia pela ajuda.

Aos amigos da Clínica da Prefeitura de Pedro Leopoldo-MG.

Aos Funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Às agências de fomento à pesquisa.

Aos indivíduos de estudo que, mesmo anônimos, doaram sua história de vida como fonte de pesquisa.

Ao ENSINO PÚBLICO que me proporcionou a honra de me formar do jardim de infância ao nível de doutorado.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) é o sexto tipo de câncer mais comum e causa 350 mil mortes no mundo a cada ano. Esta doença compreende neoplasias malignas epiteliais de revestimento que surgem na região do trato aéreo digestivo superior, e geralmente afeta homens entre a sexta e nona décadas de vida, após a exposição em longo prazo de tabaco e consumo de álcool. Tem sido relatado que a incidência de CCECP entre os pacientes com idade inferior a 45 anos está aumentando no mundo. Os fatores associados com este carcinoma em jovens não estão bem estabelecidos. Neste campo, o HPV de alto risco emergiu como um possível agente associado com CCECP em pacientes jovens. O objetivo do presente estudo foi investigar se existe alguma alteração no prognóstico ou na distribuição do HPV 16/18 em pacientes jovens com CCECP comparado com pacientes adultos. Um estudo transversal retrospectivo foi utilizado ajustando idade, sexo, estadiamento TNM, tabagismo e consumo de álcool. O HPV foi detectado por PCR com primers consenso. Não foi observada diferença na frequência de amostras HPV positivas nas lesões em jovens comparado com adultos. Não foi encontrada associação entre a positividade para o HPV de alto risco com gênero, tabagismo e localização anatômica. HPV de alto risco foi associado com TNM avançado nas análises bivariadas mas, no entanto, não afetou a sobrevida. Somente o estadiamento TNM foi associado com risco de morte. Concluindo, nosso estudo mostra que a idade não é um fator que altera a frequência do HPV16/18 nos tumores de pacientes com CCECP. Além disso, a presença do HPV16/18 não altera o prognóstico de pacientes jovens ou adultos com CCECP.

Palavras-chave: cabeça e pescoço, câncer, HPV, carcinoma de células escamosas

ABSTRACT

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common cancer and causes 350,000 deaths worldwide each year. This disease comprises epithelial malignancies arising in the paranasal sinuses, nasal cavity, oral cavity, pharynx and larynx, and usually affects men between the sixth and ninth decades of life after long-term exposure to tobacco and alcohol consumption. It has been reported that the incidence of HNSCC among patients under the age of 45 years is increasing worldwide. The factors associated with HNSCC in young are not well established. In this field, high-risk HPV has emerged as a possible agent associated with HNSCC in young patients. The purpose of the current study was to investigate if there is any change in prognosis or in the distribution of HPV-16/18 in young patients compared with adults patients. A longitudinal prospective study was used adjusted for age, gender, TNM staging, smoking and alcohol consumption. HPV was detected by PCR with consensus primers. There is no difference in the frequency of HPV-16/18 positivity when young patients were compared to the adult ones. No association was found among high-risk HPV positivity, gender, smoking habits and anatomical site. High-risk HPV were associated with advanced TNM in bivariate analyses however, it did not impact the survival. Only TNM staging was associated with risk of death. In conclusion, our study supports that age does not alter the frequency of HPV-16/18 in tumors from patients with HNSCC. In addition, HPV-16/18 presence does affect the prognosis of young patients or adults with HNSCC.

Key words: head and neck cancer; HPV; Young patients, Squamous cell carcinoma

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µl	Microlitro
µm	Micrômetro
Bp	Base pairs
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCEB	Carcinoma de células escamosas de boca
CCECP	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	DNA-metiltransferase
DNMT1	DNA-metiltransferase-1
DNMT3a	DNA-metiltransferase-3a
DNMT3b	DNA-metiltransferase-3b
EUA	Estados Unidos da América
F	Forward
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
H	Hora
HE	Hematoxilina e eosina
HNSCC	Head and neck squamous cell carcinoma
HPV	<i>Papiloma Vírus Humano</i>
ICD	International Classification of Diseases
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Min	Minuto
mM	Milimolar
Ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pmol	Picomol
R	Reverse
RFLP	Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição

RNA	Ácido ribonucléico
SCC	Squamous cell carcinoma
Sec	Segundos
<i>Taq</i> DNA polimerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polimerase
TNM	Classificação dos tumores malignos
UFMG	UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
UICC	União Internacional Contra o Câncer
UNIMONTES	UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MONTES CLAROS
WHO	World Health Organization

"Tudo vale a pena quando a alma não é pequena".
Fernando Pessoa

SUMÁRIO

1 Introdução	1
2 Referencial Teórico	3
2.1 Carcinoma de Células Escamosas	3
2.1.1 Carcinoma de Células Escamosas de cabeça e pescoço em pacientes jovens	8
2.2 Os papilomavírus humanos	8
2.3. Os papilomavírus humanos e o Câncer	9
3 Objetivos	11
3.1 Objetivo Geral	11
3.2 Objetivos Específicos	11
4 Metodologia	12
5 Artigo Científico	14
6 Considerações Finais	33
7 Conclusão	35
8 Referências	36
Anexos	

1-INTRODUÇÃO

O Carcinoma de células escamosas é a neoplasia maligna de células epiteliais que mais acomete a região de cabeça e pescoço, em diferentes sítios anatômicos. É uma doença multifatorial, sendo sua etiopatogênese relacionada a distúrbios genéticos, moleculares e ambientais. Hábitos tabagistas e etilistas representam fatores de risco para o desenvolvimento do câncer. Além da alta prevalência, esta doença caracteriza-se pela elevada mortalidade e morbidade, apresentando uma taxa de sobrevida aproximada de cinco anos, em 50% dos casos.

A carcinogênese de cabeça e pescoço tem sido vastamente estudada quanto às suas características clinicopatológicas, biologia e comportamento das células neoplásicas, além da investigação de fatores preditivos para o diagnóstico e prognóstico. Estudos recentes mostram que as regiões mais invasivas do carcinoma apresentam maior grau de anaplasia celular e interações moleculares relacionadas aos processos de invasão tumoral e ao desenvolvimento de metástases regionais. O sistema de gradação morfológica do *fronte* de invasão tumoral tem-se mostrado de grande valor preditivo para o prognóstico do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP).

O valor prognóstico de vários marcadores biológicos tumorais em câncer de cabeça e pescoço tem sido pesquisado, destacando-se a investigação de marcadores de proliferação celular, oncoproteínas, proto-oncogenes e genes supressores de tumor.

Recentemente, trabalhos na literatura têm destacado o possível papel dos vírus da família *Papillomaviridae*, principalmente os subtipos 16 e 18, na patogênese do CCECP. Estes vírus podem induzir alterações em genes supressores de tumor.

Além disso, tem sido observada uma tendência, nas últimas décadas, para o aumento no número de pacientes jovens e do sexo feminino com CCECP. Neste grupo de pacientes o contato com cigarro e álcool parece ser inferior aos pacientes mais velhos (Krolls & Hoffman, 1976). Diferenças na sobrevida entre pacientes jovens e indivíduos de idade mais avançada com CCECP de língua foram observadas recentemente (Garavello et al., 2007). Neste trabalho investigamos a hipótese da idade ser um possível fator de influência na associação do vírus HPV 16/18 com o CCECP. Além disso, estudamos o efeito destes vírus no prognóstico da doença, ajustando idade, sexo, estadiamento TNM, tabagismo e consumo de álcool.

2-REFERENCIAL TEÓRICO

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço ocupa a 6ª posição entre os tipos de cânceres mais comuns em todo o mundo e representa um sério problema de saúde pública (Campisi & Giovannelli, 2009; Day *et al.*, 2003; Tribius *et al.*, 2011). Além da grande influência genética na etiopatogênese do câncer, fatores relacionados ao estilo de vida, como o uso do tabaco e do álcool, mostram uma grande influência no desenvolvimento da doença (Barwad *et al.*, 2011; Campisi & Giovannelli, 2009).

Evidências clínicas, muitas vezes, não são relevantes para prever uma resposta ao tratamento do câncer bucal. Assim, diversas pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de se obter um maior entendimento da biologia e comportamento da doença, bem como para a descoberta de novos fatores de prognóstico que poderiam ser utilizados nas decisões de tratamento e na predição de resposta às diferentes modalidades de terapia oncológica (Blomberg *et al.*, 2011; Grabenbauer *et al.*, 2003; Tan & Ogden, 1997; Tsuchiya *et al.*, 2001).

Estudos recentes revelaram que processos neoplásicos ocorrem devido a anormalidades em oncogenes e genes supressores de tumor, que exercem um papel fundamental no controle do ciclo celular (Blomberg *et al.*, 2011; Farias *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2007;).

2.1 Carcinoma de Células Escamosas

Desde 2003, as neoplasias malignas são responsáveis por quase 17% dos óbitos de causa conhecida no Brasil e constituem-se na segunda causa de morte da população (Ministério da Saúde, 2010). No Brasil, as estimativas, para o ano de 2010 que serão válidas também para o ano de 2011, apontam para a ocorrência de

489.270 casos novos de câncer, distribuídos por sexo da seguinte forma: 236.240 casos novos para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. (Ministério da Saúde, 2010).

Anualmente, mais de 300.000 novos casos de CCE de cabeça e pescoço (CCECP) ocorrem em todo o mundo (Parkin, 2001; Tribius *et al.*, 2011). O CCECP é o sexto carcinoma mais comum, representando cerca de 3% de todas as lesões malignas em homens e 2% em mulheres (Barwad *et al.*, 2011). A cada ano, nos EUA, são diagnosticados aproximadamente 30.000 novos casos e 7.800 óbitos em decorrência do CCE de boca (CCEB) (Toruner *et al.*, 2004). A estimativa de incidência de CCEB em 2010 no Brasil aponta esse tumor como o 6° mais frequente entre os homens (com 10.330 casos estimados) e o 9° entre as mulheres (com 3.790 casos estimados) (Ministério da Saúde, 2010). A incidência de CCE aumenta com a idade, sendo maior após os 40 anos de idade, mais comum no sexo masculino e cor de pele branca (Scully & Porter, 2001).

O carcinoma de células escamosas (CCE), também conhecido como carcinoma epidermóide, é uma neoplasia maligna que é derivada ou exibe características morfológicas de epitélio escamoso. O CCE é frequentemente o estágio final de alterações no epitélio escamoso estratificado, que inicia como uma displasia epitelial e progride até que as células do epitélio displásico rompam à membrana basal e invadam o tecido conjuntivo adjacente. Algumas vezes, o CCE pode originar diretamente (*de novo*) de um epitélio de revestimento estratificado, não apresentando a fase de lesão cancerizável (Scully & Porter, 2001).

Nos estágios iniciais, o CCE pode aparecer como placas firmes, brancas e elevadas ou como áreas irregulares, ásperas ou verrucosas de espessamento da mucosa, caracterizado como leucoplasia. Ambos os padrões podem se sobrepor a

uma base de leucoplasia ou eritroplasia aparente. Com a progressão da lesão, este pode apresentar aspecto nodular ou infiltrativo, este último caracterizado por uma úlcera irregular e áspera, assintomática, com bordas elevadas, firmes e onduladas (Neville & Day, 2002). O CCE tem um crescimento infiltrativo profundo no tecido conjuntivo adjacente, com poucas alterações na superfície do epitélio e pode se apresentar como uma área endurecida com perda de mobilidade tecidual. No assoalho da cavidade bucal, por exemplo, essa lesão comumente causa a fixação da língua ou impedimento da abertura normal da boca. (Neville & Day, 2002; Scully & Porter, 2001).

O CCE é considerado agressivo por estar associado a uma acentuada morbidade e alta taxa de mortalidade, com uma sobrevida menor que 50% em um prazo de 5 anos (Blomberg *et al.*, 2011). Além disso, nas últimas quatro décadas não houve melhora no prognóstico em relação ao tratamento dessa lesão, apesar dos avanços na cirurgia, radio e quimioterapia (Blomberg *et al.*, 2011; Mork, 1998; Mork *et al.*, 2001). Uma provável explicação para os resultados sombrios obtidos pelo tratamento ocorre porque o CCE é um processo amplo levando a ineficiência terapêutica quando se emprega uma modalidade de tratamento restrito à lesão (Blomberg *et al.*, 2011; Schwartz *et al.*, 2000).

O conceito de campo de cancerização foi estabelecido em 1953 por (Slaughter *et al.*, 1953) e é baseado no fato de que a superfície epitelial do trato aerodigestivo é comumente exposta a muitas substâncias carcinogênicas como o cigarro e o álcool e, portanto, possui um risco maior de desenvolvimento de carcinomas. O desenvolvimento de um segundo tumor primário no campo de cancerização ocorre em uma razão de 20 a 30%, apesar do controle local para prevenção de uma nova neoplasia (Hong, 1987). Além disso, novos estudos

demonstraram que o campo de cancerização é expansível para qualquer tecido epitelial conforme demonstrado por estudos moleculares. O que explica o porquê de um controle local para neoplasia não ser uma terapia eficiente devido às alterações genéticas nas células (Raimondi *et al.*, 2005; Rubin, 2011). Além disso, têm-se evidenciado a existência precoce de alterações genômicas em epitélios histologicamente normais adjacentes aos carcinomas orais em áreas de tecido com alterações de microssatélites ou instabilidade cromossômica. Estas células representam populações clonais com vantagem de crescimento e uma elevada taxa proliferativa (Raimondi *et al.*, 2005).

O principal determinante para que a doença apresente um alto índice de mortalidade é o estágio avançado quando a doença é diagnosticada (Oliver *et al.*, 1996). O diagnóstico precoce do câncer é difícil por ser assintomático no princípio e as lesões iniciais são raramente identificadas pela maioria dos profissionais de saúde (Krutchkoff *et al.*, 1990).

A carcinogênese de cabeça e pescoço é um processo multifatorial, caracterizado por alterações genéticas, epigenéticas e fenotípicas (Esteller, 2006; Mehrotra & Yadav, 2006). Muitas dessas alterações envolvem a ativação de vias de sinalização ou via metabólica que favorecem o crescimento celular e as características de sobrevivência da célula (Akrish *et al.*, 2004).

A patogênese do CCECP está relacionada a fatores genéticos, como alterações em oncogenes e genes supressores de tumor, além de fatores de risco como o consumo de tabaco e álcool (De Paula *et al.*, 2009). Fumantes têm risco aumentado de duas a quatro vezes para o desenvolvimento da doença. Este risco aumenta para seis a quinze vezes se o indivíduo for tabagista e etilista (Scully & Porter, 2001). Outros fatores também podem contribuir para o CCECP, como

infecção viral por HPV (Barwad *et al.*, 2011) e exposição à radiação solar, este último, relacionado ao CCE labial (Neville & Day, 2002; Scully & Porter, 2001). Apesar da importância dos fatores causais, a incidência da doença entre pessoas expostas aos fatores de risco é relativamente baixa e o CCE surge após anos de exposição (Scully *et al.*, 2000a). O CCE também pode se desenvolver na ausência de fatores de risco, o que sugere um papel importante da susceptibilidade do hospedeiro (Scully *et al.*, 2000a). Então, ele surge como consequência de múltiplos eventos genéticos moleculares em vários genes, com consequente distúrbio dos mecanismos de sinalização e regulação do ciclo celular e/ou perturbações nos mecanismos de reparo do DNA e eliminação de células alteradas (De Paula *et al.*, 2009; Scully *et al.*, 2000a).

Os eventos moleculares mutagênicos geram instabilidade genética e aumentam a probabilidade de transformações neoplásicas. Esses eventos podem surgir em decorrência da ação de agentes químicos (carcinógenos), físicos (radiação ionizante), biológicos (Strati *et al.*, 2006) e também, de alterações que surgem espontaneamente (Scully *et al.*, 2000a). Alterações genéticas no câncer incluem mutações pontuais, amplificações, rearranjos e deleções em proto-oncogenes e genes supressores de tumor (Takes *et al.*, 1998; Willem *et al.*, 2006). A consequência desses danos genéticos é a desregulação celular com a ruptura da sinalização, de crescimento e/ou no mecanismo de reparo a danos celulares ou da eliminação de células alteradas (Scully *et al.*, 2000a). Aumento da função de oncogenes, inibição da função dos genes supressores de tumor ou seus produtos e aumento da atividade da telomerase estão envolvidos na carcinogênese (Moreira *et al.*, 2009; Scully *et al.*, 2000b).

2.1.1 Carcinoma de Células Escamosas de cabeça e pescoço em pacientes jovens

Nas últimas décadas, tem sido observada uma tendência para o aumento no número de pacientes jovens e do sexo feminino com CCECP (De Paula *et al*, 2009). Neste grupo de pacientes o contato com cigarro e álcool é muito inferior aos pacientes mais velhos (Krolls & Hoffman, 1976). Além disso, diferenças na sobrevida entre pacientes jovens e indivíduos de idade mais avançada com CCE de língua foram observadas recentemente (Garavello *et al.*, 2007). Porém resultados diferentes têm sido observados na literatura. Recentemente foi observado que, apesar de não haver diferenças entre a gradação morfológica, os pacientes com a idade mais avançada apresentavam uma taxa de metástase aumentada (Siriwardena *et al.*, 2007). Estes fatos sugerem que outros fatores etiológicos podem estar associados com o aparecimento do CCECP em pacientes jovens (Chitapanarux *et al*, 2006; De Paula *et al*, 2009; Garavello *et al.*, 2007; Krolls & Hoffman, 1976; Liao, 2006; Tremblay *et al*, 2006).

2.2 Os papilomavírus humanos

Os papilomavírus humanos (HPV) são vírus da família *Papillomaviridae* capazes de induzir lesões de pele ou de mucosa. Existem mais de 200 subtipos diferentes de HPV. Destes, os que infectam mucosas de humanos são divididos em HPV de baixo risco, os que produzem lesões benignas, e os subtipos de alto risco que estão relacionados a tumores malignos (Weaver, 2006; Willem *et al.*, 2006;).

Os vírus HPV se replicam exclusivamente no núcleo das células do hospedeiro. Eles infectam os queratinócitos na camada basal do epitélio estratificado escamoso. Seis proteínas não estruturais (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e duas proteínas

do capsídeo (L1 e L2) são inicialmente transcritas na infecção (Schiller & Davies, 2004). A interação entre algumas destas proteínas e as células do hospedeiro são responsáveis pela proliferação dos queratinócitos (Huh *et al.*, 2005; Tribius *et al.*, 2011). O sincronismo da integração viral corresponde ao desenvolvimento de carcinoma de células escamosas de alta malignidade com muita expressão de E6 e E7 (Tribius *et al.*, 2011). Estas proteínas invariavelmente têm um papel importante na carcinogênese, bem como a manutenção da transformação do fenótipo. As proteínas E6 e E7 participam da inativação de gens supressores de tumor, como o p53 e pRb respectivamente (Takashi & Tohru, 2009; Tribius *et al.*, 2011).

2.3. Os papilomavírus humanos e o Câncer

Aproximadamente 15% de todos os cânceres no mundo parecem estar associados com infecções virais (Lin *et al.*, 2005). Muitos vírus são aceitos como o principal agente etiológico de determinados tipos de câncer (Lin *et al.*, 2005; Tribius *et al.*, 2011). Os vírus HPV de alto risco têm sido identificados como fatores etiológicos dos cânceres cervicais e anogenitais (DiMaio & Liao, 2006). A associação dos vírus HPV de alto risco com o CCECP tem sido observada por vários trabalhos (Barwad *et al.*, 2011; Campisi & Giovannelli, 2009; Gillison & Shah, 2001; Strati *et al.*, 2006). O desenvolvimento de técnicas sensíveis contribuiu para identificação de HPV e foi responsável por um aumento da prevalência do HPV 16 e do HPV 18 em pacientes com carcinoma (Hobbs *et al.*, 2006; Pete *et al.*, 2002).

Algumas infecções virais estão associadas a alterações epigenéticas na carcinogênese (Wu *et al.*, 2007). Um exemplo disso é a hipermetilação do gene P16^{CDKN2A}, causada pela infecção por vírus da hepatite B e C, que leva ao

desenvolvimento de carcinoma hepatocelular. Recentemente foi observado que a presença do HPV está associada com a hipermetilação do P16^{CDKN2A} através do aumento da enzima dimetil transferase 3B (DNMT3b) em pacientes não fumantes e do sexo feminino com carcinoma de pulmão (Lea *et al*, 2004; Lin *et al*, 2005; Wu *et al*, 2007).

3-OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a associação dos vírus HPV 16/18 em diferentes faixas etárias com o CCECP, bem como o impacto destes vírus no prognóstico da doença.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar a frequência de CCECP positivos para o HPV 16/18 em pacientes jovens (abaixo dos 45 anos) com pacientes mais velhos.
- Avaliar o efeito prognóstico da presença dos vírus HPV 16/18 no CCECP, ajustando idade, sexo, estadiamento TNM, tabagismo e consumo de álcool.

4-METODOLOGIA

Este trabalho foi descrito sob a forma de artigo científico, cuja metodologia e discussão encontram-se descritas no texto do artigo submetido à publicação em periódico indexado. Os critérios para definição de tabagistas e etilistas estão descritos para complementarem a metodologia.

O consumo de álcool foi definido pela ingestão média diária total. Foram investigados o consumo de cerveja e cachaça. Uma lata de cerveja (ou seja, 330 ml) ou um copo de cachaça (ou seja, 40 ml) contém aproximadamente 12 g de etanol. Os pacientes foram classificados como consumidores de bebidas alcoólicas se tivessem ingerido pelo menos 10 doses (120 g de etanol) e como não consumidores se não tivessem consumido pelo menos 10 doses em toda sua vida. O consumo de álcool foi classificado como moderado ou pesado. Consumo pesado foi definido como volume diário determinado (por exemplo, três doses diárias), ou quantidade por ocasião (por exemplo, cinco doses numa ocasião, pelo menos uma vez por semana), ou diariamente.

O hábito do tabaco e o consumo médio diário de cigarros foram investigados. Apenas os pacientes que nunca haviam fumado eram considerados não-fumantes. Ex-consumidores de bebidas e ex-fumantes foram os indivíduos que se abstiveram de qualquer tipo de bebida e cigarro há pelo menos um ano. Em algumas situações, os pacientes que eram fumantes / ex-fumantes e consumidores e ex-consumidores de bebidas foram agrupados.

- Título: “HPV-16/18 does not affect the prognosis of head and neck squamous cell carcinoma in young and older patients.”

O artigo foi estruturado com base nas normas de publicação do periódico Journal of Oral Pathology and Medicine. Após sua apresentação, seguir-se-ão as considerações finais, bem como as referências e anexos relacionadas à tese em geral.

5- ARTIGO CIENTÍFICO

HPV-16/18 does not affect the prognosis of head and neck squamous cell carcinoma in young and older patients

Luciano Marques-Silva², Lucyana Conceição Farias¹, Carlos Alberto de Carvalho Fraga¹, Marcos Vinícius Macedo de Oliveira¹, Cláudio Marcelo Cardos³, Francis Balduino Guimaraes Santos³, Thiago Fonseca-Silva¹, Carolina Cavalieri Gomes, Alfredo Maurício Batista De-Paula¹, Ricardo Santiago Gomez², André Luiz Sena Guimarães^{1*}

¹Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Brazil.

²Department of Clinical, Surgery and Oral Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³Department of Medicine, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Brazil

***Correspondence to:**

André Luiz Sena Guimarães
Universidade Estadual de Montes Claros
Hospital Universitário Clemente de Faria
Laboratório de Pesquisa em Saúde
Avenida Cula Mangabeira, 562
Montes Claros
Minas Gerais, Brasil
cep 39401-001,
e-mail: andreluizguimaraes@gmail.com

Abstract

Background: It has been reported that the incidence of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) among patients under the age of 45 years is increasing worldwide. The factors associated with HNSCC in young adults are not well established. In this field, high-risk HPV has emerged as a possible agent associated with HNSCC in young patients. The purpose of the present paper was to assess the effect of age on the distribution of HPV 16/18 in HNSCC, together with the impact of the virus on patients' prognosis.

Patients and methods: A Longitudinal prospective study was used adjusted for age, gender, TNM staging, smoking and alcohol consumption. HPV was detected by PCR with consensus primers.

Results: There is no difference in the frequency of HPV-16/18 positivity when young patients were compared to the adult ones. No association was found among high-risk HPV positivity, gender, smoking habits and anatomical site. High-risk HPV were associated with advanced TNM in bivariate analyses however, it did not impact the survival. Only TNM staging was associated with risk of death.

Conclusion: In conclusion, our study supports that age does not influence the presence of HPV-16/18 in HNSCC and has no impact on patients' prognosis.

Key words: head and neck cancer; HPV; Young patients, Squamous cell carcinoma

Background

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is the sixth most common type of cancer and causes 350,000 cancer deaths worldwide every year (1;2). HNSCC comprises malignant epithelial neoplasms that arise in the paranasal sinuses, nasal cavity, oral cavity, pharynx, and larynx and generally affects men between the sixth and ninth decades of life following long term exposure to smoking and alcohol consumption (3). However, an increase in the incidence of head and neck cancer among patients under the age of 45 years has been reported worldwide (4-10). Some studies suggest that in young, HNSCC arises regardless of the classic risk factors (4-8;10). HPV infection has been pointed as a possible etiologic factor for such cases (11-16). HPV was detected in a variety of HNSCC (12-17) and it was suggested to be associated with malignization of potential malignant lesions in head and neck (18;19), however, divergent results are found in the literature regarding the role of HPV presence in HNSCC (20;21).

Taken these facts we investigate if there is any change in the distribution of HPV-16/18 in young patients compared to adult ones. In addition, we assessed the effect of the virus on patients' prognosis. To test these hypotheses we performed a longitudinal prospective study.

Methods

Methods

Patients

75 patients diagnosed with HNSCC recruited from a database of head and neck surgeries that occurred between 1996 and 2007 in Montes Claros, Brazil were included in the current study (4). Patients younger than 45 years old were selected (n=25). The adult patients (n=50) were random selected in a proportion of 2:1 adjusted for gender, TNM staging, anatomical site, smoking and alcohol intake. All the patients were from same geographical area and evaluated/treated by the same practitioner.

Clinical data

The mean age was 42.1 years (SD 3.17 years; range, 33-45 years) for young HNSCC patients and 62.2 years (SD 8.0 years; range, 49-82 years) for adult HNSCC patients. Skin colour was not used as a physical descriptor because it is a poor predictor of genomic ancestry in Brazil (22;23). The current investigation was approved by the local Ethics Committee. Information on age, sex, tobacco smoking history, alcohol consumption history, medical history, tumour site, TNM clinical staging, and survival was obtained from medical files.

All patients were staged according to the UICC TNM Classification of Malignant Tumors (1997) (24). HNSCC lesions were classified according to the primary site as described in the International Classification of Diseases (ICD-10) for Oncology. The anatomical sites reviewed in this study included: (1) 28 (37.3%) mouth and perioral region sites (C00, C01, C02, C04, C05, C06.0, C06.2); (2) 22 (29.3%) oropharynx (C09–C10) sites; and (3) 25 (23.4%) hypopharynx–larynx sites (C12, C13, C32). The sites were categorized according anatomical site (anterior: oral mucosa, tongue,

retromolar trigon, mouth floor, jugal mucosa, gingival border / posterior: base tongue, oropharynx, hypopharynx–larynx) All patients had histologically confirmed squamous cell carcinoma of the head and neck based on the World Health Organization criteria (WHO, 1997) (25;26). Patients with a diagnosis of carcinoma *in situ* or multiple head and neck carcinomas were excluded.

HPV identification

HPV-DNA sequences were first PCR amplified by L1 (F:5'-GCMCAGGGWCATAAYAATGG-3', R 5'-CGTCCMAARGGAWACTGATC-3', where, M=A or C, R=A or G, W=A or T, Y=C or T) and then by HPV-16 (F5'-AAGGCCAACTAAATGTCA-C-3', R 5'-CTGCTTTTATACTAACCGG-3') and HPV-18 (F 5'-ACCTTAATGAAAAACCACGA-3', R 5'-CGTCGTTTAGAGTCGTTC3'). Beta globin gene primers were used as an internal control. All primer sequences were described by Katiyar *et al* (27). Polymerase chain reaction was performed in a total volume of 25 µL containing approximately 100 ng genomic DNA as a template, 0.5 µL of each primer (20 pmol/µL), 2.5 µL dNTP-mix (25 mM of each, AMRESCO, Ohio, CA, USA), 2.5 µL 10X PCR buffer, 1.25 µL magnesium chloride (50 mM), and 2.5 units of Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) (Figure 1). All reactions were performed using positive (cultured virus) and negative (PCR without DNA) controls.

Electrophoresis

The PCR products were verified on a 6.5% polyacrylamide gel that was electrophoresed at a constant voltage of 120V for 1.5 hours and stained with silver nitrate. Electrophoresis results were estimated against a 100-bp ladder.

Statistical analysis

The statistical significance of differences between case and control group distributions for HPV positivity was evaluated using Fisher or chi-squared tests. Survival time was calculated from the date of diagnosis to the time of the last follow-up visit or to the time of death. Using these criteria, the records of each patient were reviewed from 0 to 2500 days. All deaths were the result of locoregional and/or metastatic disease. Patients who died without evidence of recurrence were excluded from analysis. Survival time was displayed by means of the Kaplan-Meier method for the variables. All variables were included in the Cox proportional hazards multivariate model. In accordance with the literature, categorical variables considered referents were those associated with a reduced risk of death. All analyses were assessed using SPSS 17.0 (SPSS Inc., Chicago), and statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

The descriptive data of the population used in the current study is represented on Table 1. The majority of patients (96%) of the population used to smoke. Moreover 88% presented advanced TNM staging.

Table 2 shows the distribution of clinical and molecular parameters according to HPV status. There is no change in the frequency of HPV-16/18 related to patient's age. No association was found among high-risk HPV positivity, gender, smoking habits and anatomical site. In combination, high-risk HPV were associated with advanced TNM in bivariate analyses (Table 2) however, it did not impact the survival (Table 3). Anatomical site and age did not interfere on the survival. Only TNM staging was associated with risk of death (Table 3).

Discussion

Currently, there are no biological mechanisms that could justify the high-risk HPV predilection for a specific anatomical site in head and neck. The role of high risk HPV in HNSCC has been recently highlighted in oropharynx (12), oral cavity (13), larynx (14), hypopharynx (15;16) and in HNSCC metastasis (17). The relevance of high-risk HPV E6/E7 protein for multiple head and neck sites carcinogenesis was demonstrated in transgenic mice (28-30). In addition, there is no consensus in the literature to establish HPV infection (21). In agreement with these facts, we did not observe high-risk HPV predilection for anatomical site. The absence of consensus is justified by the differences of study sample. It is well known that there are limitations for paraffin embedded tissues, especially because the fixation difficult to purify RNA from paraffin-embedded tissues (17;31;32). Although non-quantitative PCR-based methods do not allow for the determination of infectious activity, they show advantages because they provide greater sensitivity and specificity than in-situ hybridization techniques (21). Some evidences suggested that the P16 immunohistochemistry could be used as survival biomarker in Head and neck cancer (33) and auxiliary in high-risk HPV detection (18).

A possible association between HPV infection and the development of HNSCC in young patients has been proposed (11). In addition, it has been postulated that HPV-positive tumours represent a subgroup of HNSCC that are distinct from tobacco and alcohol induced carcinomas (19). An absence of *p16^{CDKN2A}* mutations as well as the expression of P16 is the characteristic feature of high risk HPV positive tumours, in contrast to the inactivation of *p16^{CDKN2A}* gene in HPV-negative tumours (34). P16 protein plays an important role in the regulation of the G1/S phase cell cycle checkpoint (33;35;36) and it has been reported that P16 positive tumors have a

better prognosis than P16 negative tumors (33). Therefore, P16 expression might explain why HPV-positive tumors show a favourable prognosis as compared to HPV-negative tumors. In the current study HPV-16/18 were not associated with age or survival. The explanation for these findings could be the rigorous criteria selection (age, gender, TNM staging and anatomical site) or by the simultaneous presence of some of these independent variables alters the evolution of cancer in a different way. Moreover, most of our patients were smokers. Our data are in agreement with previous studies (20). Several evidences suggest that genetic and epigenetic factors are associated with a susceptibility to cancer development at young age (4;37). Alternatively, genetic and epigenetics factors may play a stronger role than HPV-16/18 infection in the development of HNSCC at an early age (38-42). In the current study, we did not observed differences in survival related to age, in agreement with previous studies (4;37).

The mechanisms underlying the association between high-risk HPV and HNSCC have been unclear. Studies using SCC samples shed light on the role of high-risk HPV infection in epigenetic regulation (43). For example, it was suggested that HPV-16 induces methylation of *p16^{CDKN2A}* (44) however, as oncogenic HPV neutralises phosphorylated Rb (PRb)-mediated control of the cell cycle, there would be no advantage for the HPV infected host cell to block the same signalling pathway at another checkpoint by down regulating *p16^{CDKN2A}* (45-47).

In conclusion, our study supports that there is no changes in frequency of HPV-16/18 in young patients when compared to the adult ones. In addition, HPV-16/18 presence did not change the HNSCC prognosis.

Competing interests

None declared

Acknowledgements

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG). Dr Guimarães and Dr Gomez are research fellow of CNPq. Dr De Paula is a research fellow of FAPEMIG.

Reference List

- (1) Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2(9):533-43.
- (2) Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005;55(2):74-108.
- (3) Argiris A, Eng C. Epidemiology, staging, and screening of head and neck cancer. *Cancer Treat Res* 2003;114:15-60.
- (4) De Paula AM, Souza LR, Farias LC et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncol* 2009;45(9):777-82.
- (5) Garavello W, Spreafico R, Gaini RM. Oral tongue cancer in young patients: a matched analysis. *Oral Oncol* 2007;43(9):894-7.
- (6) Gawecki W, Kostrzewska-Poczekaj M, Gajecka M, Milecki P, Szyfter K, Szyfter W. The role of genetic factor in etiopathogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck in young adults. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2007;264(12):1459-65.
- (7) Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya S. Factors associated with delay in presentation among younger patients with oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97(6):707-13.
- (8) Manuel S, Raghavan SK, Pandey M, Sebastian P. Survival in patients under 45 years with squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2003;32(2):167-73.
- (9) Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2000;122(1):44-51.
- (10) Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA et al. Analysis of histopathological and immunohistochemical differences of oral squamous cell carcinoma in young and old patients in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med* 2007;36(6):357-62.
- (11) Zhang ZY, Sdek P, Cao J, Chen WT. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004;33(1):71-4.
- (12) D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356(19):1944-56.
- (13) Saini R, Tang TH, Zain RB et al. Significant association of high-risk human papillomavirus (HPV) but not of p53 polymorphisms with oral squamous cell carcinomas in Malaysia. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010.

- (14) Torrente MC, Rodrigo JP, Haigentz M, Jr. et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck* 2010.
- (15) Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: Focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer* 2010.
- (16) Baumann JL, Cohen S, Evjen AN et al. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope* 2009;119(8):1531-7.
- (17) Barwad A, Sood S, Gupta N, Rajwanshi A, Panda N, Srinivasan R. Human papilloma virus associated head and neck cancer: A PCR based study. *Diagn Cytopathol* 2011.
- (18) Angiero F, Gatta LB, Seramondi R et al. Frequency and role of HPV in the progression of epithelial dysplasia to oral cancer. *Anticancer Res* 2010;30(9):3435-40.
- (19) Hoffmann M, Gorogh T, Gottschlich S et al. Human papillomaviruses in head and neck cancer: 8 year-survival-analysis of 73 patients. *Cancer Lett* 2005;218(2):199-206.
- (20) Salem A. Dismissing links between HPV and aggressive tongue cancer in young patients. *Ann Oncol* 2010;21(1):13-7.
- (21) Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 2010;11(8):781-9.
- (22) Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(1):177-82.
- (23) Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006;62(4):190-5.
- (24) Sobin LH. TNM: evolution and relation to other prognostic factors. *Semin Surg Oncol* 2003;21(1):3-7.
- (25) Broders AC. Squamous-cell epithelioma of the skin: a study of 256 cases. *Ann Surg* 1921;73(2):141-60.
- (26) Bryne M, Nielsen K, Koppang HS, Dabelsteen E. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. *J Oral Pathol Med* 1991;20(8):369-72.
- (27) Katiyar S, Hedau S, Jain N et al. p53 gene mutation and human papillomavirus (HPV) infection in esophageal carcinoma from three different endemic geographic regions of India. *Cancer Lett* 2005;218(1):69-79.
- (28) Ocadiz-Delgado R, Marroquin-Chavira A, Hernandez-Mote R et al. Induction of focal epithelial hyperplasia in tongue of young bk6-E6/E7 HPV16 transgenic mice. *Transgenic Res* 2009;18(4):513-27.

- (29) Strati K, Pitot HC, Lambert PF. Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive versus HPV-negative head and neck cancers in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(38):14152-7.
- (30) Jabbar S, Strati K, Shin MK, Pitot HC, Lambert PF. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins act synergistically to cause head and neck cancer in mice. *Virology* 2010;407(1):60-7.
- (31) Coombs NJ, Gough AC, Primrose JN. Optimisation of DNA and RNA extraction from archival formalin-fixed tissue. *Nucleic Acids Res* 1999;27(16):e12.
- (32) Lehmann U. MicroRNA-profiling in formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *Methods Mol Biol* 2010;667:113-25.
- (33) Fischer CA, Zlobec I, Green E et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer* 2010;126(5):1256-62.
- (34) Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006;59(5):445-53.
- (35) Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16(INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett* 2001;163(2):221-8.
- (36) Reed AL, Califano J, Cairns P et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56(16):3630-3.
- (37) Farias LC, Fraga CA, De Oliveira MV et al. Effect of age on the association between p16CDKN2A methylation and DNMT3B polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. *Int J Oncol* 2010;37(1):167-76.
- (38) Diniz MG, Borges ER, Guimaraes AL et al. PTCH1 isoforms in odontogenic keratocysts. *Oral Oncol* 2009;45(3):291-5.
- (39) Gomes CC, Drummond SN, Guimaraes AL, Andrade CI, Mesquita RA, Gomez RS. P21/ WAF1 and cyclin D1 variants and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2008;37(3):151-6.
- (40) Moreira PR, Guimaraes MM, Guimaraes AL et al. Methylation of P16, P21, P27, RB1 and P53 genes in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2009;38(1):99-103.
- (41) Liu Z, Wang L, Wang LE, Sturgis EM, Wei Q. Polymorphisms of the DNMT3B gene and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study. *Cancer Lett* 2008;268(1):158-65.
- (42) Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet* 2008;371(9625):1695-709.

- (43) Wu MF, Cheng YW, Lai JC et al. Frequent p16INK4a promoter hypermethylation in human papillomavirus-infected female lung cancer in Taiwan. *Int J Cancer* 2005;113(3):440-5.
- (44) Lin TS, Lee H, Chen RA et al. An association of DNMT3b protein expression with P16INK4a promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Lett* 2005;226(1):77-84.
- (45) Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Marton IJ. Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(3):344-52.
- (46) Munger K, Basile JR, Duensing S et al. Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001;20(54):7888-98.
- (47) Cuschieri K, Wentzensen N. Human papillomavirus mRNA and p16 detection as biomarkers for the improved diagnosis of cervical neoplasia. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(10):2536-45.

Figure1

Figure 1A- PCR for HPV-16 Lane 1: 100-bp molecular marker. Lane 2: HPV-16 positive (217-bp).

Figure 1B- PCR for HPV-18 Lane 1: 100-bp molecular marker. Lane 2: HPV-18 positive (100-bp).

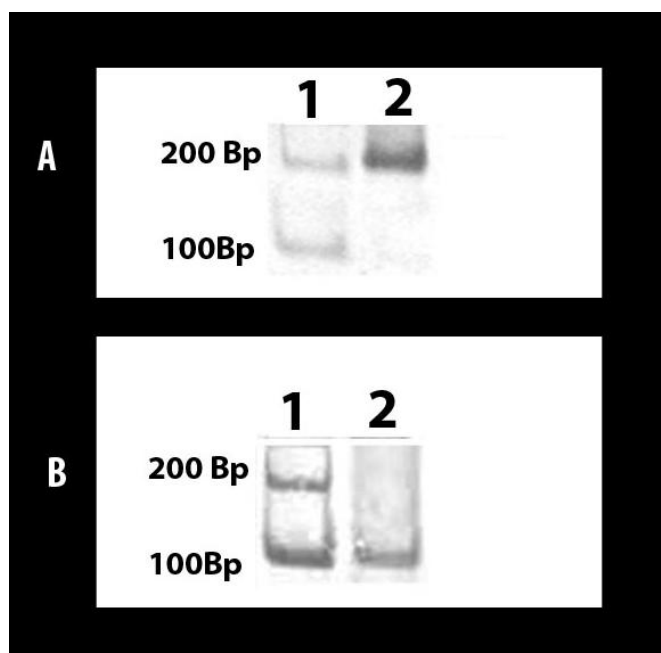


Table I- The distribution of clinical parameters.

	Frequencies	
	n	%
Age		
Adult	50	66.7
Young	25	33.3
Gender		
Male	64	85.3
Female	11	14.7
Tobacco Habit		
Smoking	72	96.0
No smoking	3	4.0
TNM Staging		
TNM I/II	9	12.0
TNMIII/IV	66	88.0
Lesion Site		
Anterior	28	37.3
Posterior	47	62.7
Anatomical Site		
Hypopharynx	8	10.7
Larynx	17	22.7
Oropharynx	22	29.3
Oral Cavity	28	37.3

Table II- The distribution of clinical and molecular parameters according to a positive HPV status.

	HPV16-	HPV16+	<i>p</i>	HPV-18 -	HPV-18+	<i>P</i>	HPV-16/18 -	HPV-16/18+	<i>p</i>
Age									
Adult	38 (69.1%)	12 (60.0%)		26 (63.4%)	24 (70.6%)		19 (63.3%)	31 (68.9%)	
Young	17 (30.9%)	08 (40.0%)	0.318	15 (36.6%)	10 (29.4%)	0.342	11 (36.7%)	14 (31.1%)	0.399
Gender									
Masculine	58 (86.6%)	06 (75%)		34 (82.9%)	30 (88.2%)		26 (86.7%)	38 (84.4%)	
Feminine	09 (13.4%)	02 (25%)	0.333	07 (17.1%)	04(11.8%)	0.378	04 (13.3%)	07 (15.6%)	0.533
Smoking Habbit									
Smoking	54 (98.2%)	18 (90.0%)		39 (95.1%)	33 (97.1%)		29 (96.7%)	43 (95.6%)	
No smoking	01 (1.8%)	02 (10.0%)	0.172	02 (4.9%)	01 (2.9%)	0.464	01 (3.3%)	02 (4.4%)	0.650
TNM Staging									
TNM I/II	07 (12.7%)	02 (10.0%)		07 (17.1%)	02 (5.9%)		07 (23.3%)	02 (4.4%)	
TNMIII/IV	48 (87.3%)	18 (90.0%)	0.552	34 (82.9%)	32 (94.1%)	0.129	23 (76.7%)	43 (95.6%)	0.018
Lesion Site									
Anterior	20 (36.4%)	06 (30.0%)		15 (36.6%)	11 (32.4%)		10 (33.3%)	16 (35.6%)	
Posterior	35 (63.6%)	14 (70.0%)	0.411	26 (63.4%)	23 (67.6%)	0.445	20 (66.7%)	29 (64.4%)	0.522
Anatomical Site									
Hypopharynx	05 (9.1%)	03 (15%)		02 (4.8%)	06 (18.2%)		02 (6.6%)	06 (13.3%)	
Larynx	10 (18.2%)	07 (35%)		13 (31.0%)	04 (12.1%)		08 (26.7%)	09 (20.0%)	
Oropharynx	18 (32.7%)	04 (20%)		10 (23.8%)	12 (36.4%)		08 (26.7%)	14 (31.1%)	
Oral Cavity	22 (40.0%)	06 (30%)	0.319	17 (40.4%)	11 (33.3%)	0.105	12 (40.0%)	16 (35.6%)	0.725

Table III –Survival analyses according to patient groups

	<i>p</i>	OR	95,0% CI Lower	Upper
All patients risk of death*				
<u>TNM</u>				
I/II	Referent			
III/IV	0.015	6.052	1.423	25.742
<u>Age</u>				
Young	Referent			
Adult	0.394	1.316	0.700	2.474
<u>Site</u>				
Anterior	Referent			
Posterior	0.317	0.741	0.412	1.333
<u>HPV-16/18</u>				
HPV -	Referent			
HPV +	0.886	0.957	0.527	1.739

In bold: significant *p*-value<0.05 * Analysed by Cox regression analyses in the HNSCC patients with a follow-up of 0-2500days

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

É sabidamente estabelecida a grande influência de alterações genéticas e agentes ambientais no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Não há um conhecimento preciso da importância dos fatores genéticos e ambientais, em relação a diferentes faixas etárias de acometimento, tendo em vista o crescente aumento da incidência em adultos jovens. Alguns tipos de HPV de alto risco, polimorfismos genéticos e metilação de genes envolvidos no controle do ciclo celular podem estar associados ao desenvolvimento e risco para o câncer de cabeça e pescoço. Nesse estudo, buscou-se verificar a associação entre o HPV16 e o HPV18 com a idade e demais parâmetros clínico-patológicos da doença. Embora não tenha sido identificada associação significativa entre os parâmetros clínicos e a presença de HPV de alto risco, sugere-se, em conformidade com outros estudos, que fatores diversos podem ter influência na carcinogênese, talvez, exercendo efeitos distintos em relação à idade.

Verificou-se, nesse estudo, que não existe diferença na sobrevivência de jovens em comparação com pacientes de idade mais avançada com CCECP. Não existe também diferença entre ambos os grupos de pacientes quanto à presença dos HPV16/18.

Outro estudo do nosso grupo de pesquisa investigou a associação entre a metilação do gene *P16^{CDKN2A}*, o polimorfismo DNMT3B (C46359T) e demais parâmetros clínico-patológicos da doença com a idade (artigo em anexo: Farias *et al*, 2010). A análise estatística pelo teste X^2 revelou que a metilação do gene *P16^{CDKN2A}*, em pacientes adultos, foi associada ao tabagismo e, em jovens, foi associado ao gênero e história de câncer familiar. O polimorfismo DNMT3B (C46359T) foi significativamente diferente em comparação ao estadiamento clínico

TNM e tamanho do tumor em pacientes adultos. Nenhuma associação em relação ao polimorfismo foi observada em jovens. Embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre o polimorfismo DNMT3B (C46359T) e a metilação do gene *P16^{CDKN2A}*, entre indivíduos jovens e adultos, sugere-se, em conformidade com outros estudos, que fatores diversos podem ter influência na carcinogênese, talvez, exercendo efeitos distintos em relação à idade. Cogita-se, ainda, a hipótese de que outros polimorfismos no mesmo gene, já descritos anteriormente, possam estar associados a diferentes padrões de metilação do gene *P16^{CDKN2A}*.

Tendo em vista a complexidade da doença e a necessidade de um maior entendimento dos mecanismos envolvidos em diferentes faixas etárias, mais estudos são necessários para elucidar o CCECP tanto em sua etiopatogênese como no comportamento biológico.

7-CONCLUSÃO

No presente trabalho, concluímos que a presença dos HPV16/18 não é influenciada pela idade e não afeta o prognóstico de pacientes com CCECP.

8-REFERÊNCIAS

1. AKRISH, S.; BUCHNER, A.; DAYAN, D. Oral cancer: diagnostic options as an aid to histology in order to predict patients at high risk for malignant transformation. *Refuat. Hapeh. Vehashinayim*. 21:6-15, 93, 2004.
2. BARWAD, A.; SOOD, S.; GUPTA, N. Human papilloma virus associated head and neck cancer: A PCR based study. *Diagnostic Cytopathol*. In press 2011.
3. BLOMBERG, M.; NIELSEN, A.; MUNK, C. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: Focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer*. 129:3:733-741, 2011.
4. CAMPISI, G.; GIOVANNELLI, L. Controversies surrounding human papilloma virus infection, head & neck vs oral cancer, implications for prophylaxis and treatment. *Head Neck Oncol*. 30:1:8, 2009.
5. CHITAPANARUX, I.; LORVIDHAYA, V.; SITTITRAI, P.; PATTARASAKULCHAI, T.; THARAVICHITKUL, E.; SRIUTHAISIRIWONG, P.; KAMNERDSUPAPHON, P.; SUKTHOMYA, V. Oral cavity cancers at a young age: Analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. *Oral Oncology*. 42:83–88, 2006.
6. DAY, T.A.; DAVIS, B.K.; GILLESPIE, M.B.; JOE, J.K.; KIBBEY, M.; MARTIN-HARRIS, B.; NEVILLE, B.; RICHARSON, M.S.; ROSENZWEIG, S.; SHARMA, A.K.; SMITH, M.M.; STEWART, S.; STUART, R.K. Oral Cancer treatment. *Curr Treat Options Oncol*. 4:27-41, 2003.
7. DE PAULA, A.M.B.; SOUZA, L.R.; FARIAS, L.C.; CORRÊA, G.T.B.; FRAGA, C.A.C.; ELEUTÉRIO, N.B.; SILVEIRA, A.C.O.; SANTOS, F.B.G.; HAIKAL, D.S.; GUIMARÃES, A.L.S.; GOMEZ, R.S. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. *Oral Oncology*. 45:9:777-782, 2009.

8. DIMAIO, D. & LIAO, J.B. Human papillomaviruses and cervical cancer. *Adv. Virus Res.* 66:125-159, 2006.
9. ESTELLER, M. The necessity of a human epigenome project. *Carcinogenesis* 27:1121-1125, 2006.
10. FARIAS, L.C.; FRAGA, C.A.C.; DE OLIVEIRA, M.V.M.; SILVA, T.F.; MARQUES-SILVA, L.; MOREIRA, P.R.; DE PAULA, A.M.B.; GOMEZ, R.S.; GUIMARÃES, A.L.S. Effect of age on the association between p16CDKN2A methylation and DNMT3B polymorphism in head and neck carcinoma and patient survival. *Int J Oncol.* 37: 167-176, 2010.
11. GARAVELLO, W.; SPREAFICO, R.; GAINI, R.M. Oral tongue cancer in young patients: A matched analysis. *Oral Oncol.* 43:9:894-897, 2007.
12. GILLISON, M.L. & SHAH, K.V. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol.* 13(3):183-188, 2001.
13. GRABENBAUER, G.G.; SUCKORADA, O.; NIEDOBITEK, G.; RODEL, F.; IRO, H.; SAUER, R.; RODEL, C.; SCHULTZEMOSGAU, S.; DISTEL, L. Imbalance between proliferation and apoptosis may be responsible for treatment failure after postoperative radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Oral Oncology.* 39:459-469, 2003.
14. Hobbs, C.G.; Sterne, J.A.; Bailey, M.; Heyderman, R.S.; Birchall, M.A.; Thomas, S.J. human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol.* 31:4:259-266, 2006.
15. HONG, W.K. Multiple primary squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am. J. Clin. Oncol.* 10:182-183, 1987.
16. HUH KW, DEMASI J, OGAWA H, NAKATANI Y, HOWLEY PM, MÜNGER K. Association of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein with the 600-

kDa retinoblastoma protein-associated factor, p600. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9:102:32:11492-11497, 2005.

17. KROLLS, S.O.; HOFFMAN, S. Squamous cell carcinoma of the oral soft tissues: a statistical analysis of 14,253 cases by age, sex, and race of patients. *J. Am. Dent. Assoc.* 92:571-574., 1976.
18. KRUTCHKOFF, D.J.; CHEN, J.K.; EISENBERG, E.; KATZ, R.V. Oral cancer: a survey of 566 cases from the University of Connecticut Oral Pathology Biopsy Service, 1975-1986. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 70:192-198, 1990.
19. LEA, J.S.; COLEMAN, R.; KURIEN, A; SCHORGE, J.O.; MILLER, D.S.; MINNA, J.D.; MULLER, C.Y. Aberrant p16 methylation is a biomarker for tobacco exposure in cervical squamous cell carcinogenesis. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 190:674-679, 2004.
20. LIAO, C.; WANG, H.; HSIEH, L.; CHANG, J.T.; NG, S.; HSUEH, C.; LEE, L.; LIN, C.H.; CHEN, I.; KANG, C.; HUANG, S.; YEN, T. Higher distant failure in young age tongue cancer patients. *Oral Oncology.* 42:718– 725, 2006.
21. LIN, T.S.; LEE, H.; CHEN, R.A.; HO, M.L.; LIN, C.Y.; CHEN, Y.H.; TSAI, Y.Y.; CHOU, M.C. & CHENG, Y.W. An association of DNMT3b protein expression with P16INK4a promoter hypermethylation in non-smoking female lung cancer with human papillomavirus infection. *Cancer Lett.* 226:77-84, 2005.
22. MEHROTRA, R.; YADAV, S. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J. Cancer* 43:60-66, 2006.
23. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa 2010: Incidência de câncer no Brasil. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional De Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2010.

- 24.** MOREIRA, P.R.; GUIMARÃES, M.M.; GUIMARÃES, A.L. Methylation of P16, P21, P27, RB1 and P53 genes in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med.* 38: 99-103, 2009.
- 25.** MORK, J. Forty years of monitoring head and neck cancer in Norway--no good news. *Anticancer Res.* 18:3705-3708, 1998.
- 26.** MORK, J.; LIE, A.K.; GLATTRE, E.; HALLMANS, G.; JELLUM, E.; KOSKELA, P.; MOLLER, B.; PUKKALA, E.; SCHILLER, J.T.; YOUNGMAN, L.; LEHTINEN, M. & DILLNER, J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med.* 344:1125-1131, 2001.
- 27.** NEVILLE, B.W.; DAY, T.A. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J. Clin.* 52:195-215, 2002.
- 28.** OLIVER, A.J.; HELFRICK, J.F.; GARD, D. Primary oral squamous cell carcinoma: a review of 92 cases. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 54:949-954, 1996.
- 29.** PARKIN, D.M. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2:533-543, 2001.
- 30.** PETE, I.; SZIRMAI, K.; CSAPO, Z.; SZANTHO, A.; FULE, T.; GALLAI, M. & KOVALSZKY, I. Detection of high-risk HPV (16, 18, 33) in situ cancer of the cervix by PCR technique. *Eur. J. Gynaecol. Oncol.* 23:74-78, 2002.
- 31.** RAIMONDI, A.; CABRINI, R.; ITOIZ, M.E. Ploidy analysis of field cancerization and cancer development in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. *J Oral Pathol Med.* 34:4:227-231, 2005.
- 32.** RUBIN, H. Fields and field cancerization: the preneoplastic origins of cancer: asymptomatic hyperplastic fields are precursors of neoplasia, and their progression to tumors can be tracked by saturation density in culture. *Bioessays.* 33:3:224-231, 2011.

33. SCHILLER, J.T. & DAVIES, P. Delivering on the promise: HPV vaccines and cervical cancer. *Nat. Rev. Microbiol.* 2:343-347, 2004.
34. SCHWARTZ, G.J.; MEHTA, R.H.; WENIG, B.L.; SHALIGRAM, C.; PORTUGAL, L.G. Salvage treatment for recurrent squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck.* 22:34-41, 2000.
35. SCULLY, C.; FIELD, J.K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 36:256-263, 2000a.
36. SCULLY, C.; FIELD, J.K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. *Oral Oncol.* 36:311-327, 2000b.
37. SCULLY, C.; PORTER, S. Oral cancer. *West J. Med.* 174:348-351, 2001.
38. SIRIWARDENA, B.S.; TILAKARATNE, A.; AMARATUNGA, E.A.; UDAGAMA, M.N.; OGAWA, I.; KUDO, Y.; TAKATA, T.; TILAKARATNE, W.M. Analysis of histopathological and immunohistochemical differences of oral squamous cell carcinoma in young and old patients in Sri Lanka. *J. Oral Pathol. Med.* 36:357-362, 2007.
39. SLAUGHTER, D.; SOUTHWICK, H.; SMEJKAL, W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: Clinical Implications of Multicentric Origin. *Cancer.* 6:5:963-968, 1953.
40. STRATI, K.; PITOT, H.C.; LAMBERT, P.F. Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive versus HPV-negative head and neck cancers in a mouse model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:14152-14157, 2006.
41. TAKES, R.P.; BAATENBURG DE JONG, R.J.; SCHUURING, E.; LITVINOV, S.V.; HERMANS, J.; VAN KRIEKEN, J.H. Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res.* 18:4793-4800, 1998.

42. TAN, L.K.S.; OGDEN, G.R. p53 over-expression in laryngeal carcinoma is not predictive of response to radiotherapy. *Oral Oncology*. 33:3:177-181, 1997.
43. TAKASHI, Y. AND TOHRU, K. Molecular mechanisms of cervical carcinogenesis by high-risk human papillomaviruses: novel functions of E6 and E7 oncoproteins. *Rev. Med. Virol.* 19: 97–113, 2009.
44. TORUNER GA, ULGER C, ALKAN M, GALANTE AT, RINAGGIO J, WILK R, TIAN B, SOTEROPOULOS P, HAMEED MR, SCHWALB MN, DERMODY JJ. Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet.* 1:154:27-35, 2004.
45. TREMBLAY, S.; REIS, P.P.; BRADLEY, G.; GALLONI, N.N.; PEREZ-ORDONEZ, B.; FREEMAN, J.; BROWN, D.; GILBERT, R.; GULLANE, P.; IRISH, J.; KAMEL-REID, S. Young Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 132:958-966, 2006.
46. TRIBIUS S, IHLOFF AS, RIECKMANN T, PETERSEN C, HOFFMANN M. Impact of HPV status on treatment squamous cell cancer of the oropharynx: What we know and what we need to know. *Cancer Lett.* 304:2:71-79, 2011.
47. TSUCHIYA, K.; SHIRATO, H.; NISHIOKA, T.; YAMAZAKI, A.; HASHIMOTO, S.; KAGEI, K.; OOMORI, K.; YASUDA, M.; SHINDO, M.; MIYASAKA, K. Pretreatment apoptotic scores do not predict response to radiation therapy in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 37:159-163, 2001.
48. WEAVER, B.A. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J. Am. Osteopath. Assoc.* 106:S2-S8, 2006.
49. WILLEM, P.; BROWN, J.; SCHOUTEN, J. A novel approach to simultaneously scan genes at fragile sites. *BMC. Cancer.* 6:205, 2006.
50. WU, Y.; LIN, J.S. DNA methyltransferase 3B promoter polymorphism and its susceptibility to primary hepatocellular carcinoma in the Chinese Han

nationality population: A case-control study. *World J Gastroenterol.* 13:45:6082-6086, 2007.

ANEXOS

ARTIGOS PUBLICADOS