

Presença do papilomavírus humano em lesões malignas de mucosa oral

Presence of human papillomavirus in malignant oral lesions

Christiane Pienna Soares¹, Iran Malavazi¹, Rosana Inácio dos Reis¹,
Karina Antunes Neves², José Antonio Sampaio Zuanon³,
Carlos Benatti Neto², Luis Carlos Spolidório²,
Maria Rita Brancini de Oliveira²

Resumo O objetivo deste estudo foi investigar a prevalência do papilomavírus humano 6/11 e 16/18 em pacientes, com lesões orais clinicamente diagnosticadas como leucoplasias, atendidas na Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, Brasil. Após a inclusão em parafina, os cortes corados com H&E, foram selecionadas 30 biópsias e separadas em 3 grupos: lesões sem displasia (n=10), lesões com diferentes graus de displasia (n=10) e carcinoma espinocelular invasivo (n=10). As lesões que apresentaram displasia epitelial foram classificadas de acordo com os critérios histopatológicos propostos por Van Der Waal. As lesões foram investigadas para a presença de HPV por hibridização *in situ* com sondas biotiniladas de amplo espectro, 6/11 e 16/18. HPV 16/18 foi detectado em 20% (n=2) das biópsias com displasia severa. A presença de HPV 16/18 em lesões malignas sugere sua importância como fator de risco na carcinogênese oral.

Palavras-chaves: Papilomavírus Humano. Oral. Leucoplasia. Carcinoma espinocelular invasivo. Hibridização *in situ*.

Abstract The purpose of this study was to investigate the prevalence of human papillomavirus 6/11 and 16/18 in patients, with oral lesions clinically diagnosed as leucoplakia, attending the School of Dentistry, University of São Paulo State/UNESP, Brazil. After paraffin embedded process, in the sections staining with H&E, 30 biopsies were screened and separated on 3 groups: 10 oral lesions without dysplasia, 10 with dysplasia, and 10 with invasive squamous cell carcinoma. The lesions with dysplasia were classified in agreement with Van Der Waal's histopathological standard method. Oral lesions were investigated for the presence of human papillomavirus (HPV) by *in situ* hybridization with wide-spectrum, 6/11 and 16/18 biotinylated probes. HPV 16/18 was found in 20% (n=2) of the leucoplakia with severe-degree dysplasia. The presence of HPV 16/18 in malignant lesions suggests its importance as a risk factor for oral carcinogenesis.

Key-words: Human papillomavirus. Oral. Leucoplakia. Invasive squamous cell carcinoma. *In situ* hybridization.

O câncer bucal é um grave e crescente problema de saúde pública no Brasil, correspondendo a 4% de todos os tipos de câncer, ocupando o oitavo lugar entre os tumores que acometem o homem e o décimo primeiro entre as mulheres¹. O carcinoma de células escamosas é a neoplasia mais comum na mucosa oral, representando 90% dos tumores malignos dessa região²⁸. O diagnóstico do câncer oral é simples e deve ser precoce, pois sua

evolução natural é rápida e num estágio avançado não é possível o tratamento, evoluindo para a morte do indivíduo¹³. Além disso, os pacientes apresentam seqüelas estéticas ou funcionais do aparelho estomatognático. Por outro lado, o diagnóstico tardio resulta no aumento dos custos com o tratamento e prolongado tempo de internação hospitalar do paciente, ocasionando severo impacto no sistema de saúde¹⁴.

1. Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP.
2. Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP. 3. Instituto de Química de Araraquara da Universidade Estadual de São Paulo, Araraquara, SP.

Apoio financeiro: Auxílio à Pesquisa/FAPESP

Endereço para correspondência: Prof^a. Christiane Pienna Soares. Dep^o de Análises Clínicas/Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/ UNESP.

R. Expedicionários do Brasil 1621, Centro, 14801-902 Araraquara, SP.

Tel: 16 201-6559, Fax: 16 232-0880

E-mail: soarescp@hotmail.com

Recebido para publicação em 16/4/2002.

O papilomavírus humano (HPV) é um vírus epiteliotrófico, capaz de infectar pele e mucosa em vários sítios corporais e, até o momento, já foram identificados 85 tipos totalmente sequenciados³⁵. A associação entre câncer e infecção pelo HPV no epitélio do trato genital masculino e feminino já é bem conhecida. Na mucosa oral, entretanto, é ainda controversa com alguns estudos demonstrando a presença viral e sua correlação com a carcinogênese^{20 23 24 29}, enquanto outros estudos não consideram sua participação no câncer oral^{5 21}. A presença na mucosa oral dos tipos anogenitais, HPV 6/11 e 16/18, poderia significar transmissão oro genital,

o que tornaria este vírus um importante cofator no desenvolvimento do câncer oral assim como é considerado no colo uterino^{23 26 31}. A possibilidade da infecção por HPV ser a etiologia do câncer oral foi relatada por Syrjanen et al³¹ em 1987, e continua sendo alvo de vários estudos^{19 22 24 35}. Nas lesões orais, entre elas as leucoplasias, fatores combinados incluindo a infecção pelo HPV, aumentam o risco de transformação maligna celular^{12 26 27}. No presente estudo, utilizou-se reação de hibridização *in situ* (HIS) para verificar a presença de HPVs comuns no trato anogenital em lesões benignas, com displasia ou carcinoma epinocelular invasivo da mucosa oral.

MATERIAL E MÉTODOS

Trinta biópsias de mucosa oral foram obtidas dos arquivos do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (UNESP), de pacientes de ambos os sexos e com idade de 35 a 80 anos, atendidos nas Clínicas de Cirurgia desta faculdade nos anos 1992 a 1998. Os cortes foram corados pela hematoxilina/eosina (H&E) e classificados de acordo com critérios histopatológicos propostos por van der Waal e cols³³ e separados em três grupos distintos, denominados LSD - lesões sem displasia (n=10), LCD - lesões com displasia epitelial (n=10) e CEI - carcinoma espinocelular invasivo de mucosa oral (n=10). As lesões sem displasia epitelial apresentavam hiperqueratose e acantose. Cortes histológicos de 5µm foram colocados em lâminas silanizadas (3- aminopropil-trietoxisilano-SIGMA) e submetidos a reação de hibridização *in situ* (HIS), utilizando sondas biotiniladas para HPV (amplo espectro, 6/11 e 16/18 – DAKO). As biópsias positivas para sonda amplo espectro foram posteriormente submetidas à nova reação de HIS para a determinação do tipo viral. Primeiramente, foi realizada a desparafinização dos cortes e estes foram submetidos a banhos em tampão *standard saline citrate* duas vezes concentrado (2x SSC, 0,3M NaCl, 0,03M C₆H₅Na₃O₇), lavagem em solução recém preparada de HCl 0,2 N e nova lavagem em tampão 2x SSC. Em seguida, foi realizada digestão enzimática com proteinase K (20µg/ml - GIBCO), a 37°C por 4 minutos, nova lavagem em tampão 2x SSC, trietanolamina 0,1M com 0,6ml de anidrido acético (10 minutos a temperatura ambiente) e outra lavagem em tampão 2x SSC. Os cortes foram

então submetidos a desidratação em álcool absoluto e procedimentos de desnaturação e hibridização, colocando-se sondas de amplo espectro ou 6/11 ou 16/18 sobre os cortes e aquecimento em placa a 95°C por 10 minutos. As lâminas foram resfriadas rapidamente e incubadas *overnight*, em câmara úmida a 37°C. Após a incubação, as lâminas sofreram lavagem estridente em tampão TRIS-HCl 0,05M em temperatura ambiente, seguida de lavagem em tampão 2x SSC, tampão 1x SSC (0,15M NaCl, 0,015M C₆H₅Na₃O₇) e 0,5x SSC (0,075M NaCl, 0,00075M C₆H₅Na₃O₇) previamente aquecidos (37°C) e, finalmente, lavagem em tampão TRIS-HCl 0,05M. Em seguida, as lâminas foram incubadas com Strepto-ABC (kit Genpoint, DAKO) a 37°C por 15 minutos, lavagem em tampão TRIS-HCl 0,05M, incubação com biotil-tiramida (kit Genpoint, DAKO) a 37°C por 15 minutos, lavagem em tampão TRIS-HCl 0,05M, incubação com Strepto-Peroxidase (kit Genpoint, DAKO), a 37°C por 15min e lavagem em tampão TRIS-HCl 0,05M. A revelação da reação de HIS foi realizada com diaminobenzidina a 40mg% e peróxido de hidrogênio dissolvida em tampão salina fosfato e seguida de lavagem em água corrente e destilada. As lâminas foram então contracoradas com Hematoxilina de Mayer, lavadas em água amoniacal, água destilada, desidratadas e montadas em Entellan (MERCK).

As reações de HIS foram acompanhadas de controle positivo (Kit Genpoint – DAKO), controle negativo (kit Genpoint – DAKO, subtraindo-se a sonda) e controle de reação, utilizando-se biópsia de mucosa oral normal.

RESULTADOS

Os resultados estão demonstrados nas Figuras 1 a 5 e na Tabela 1. Carcinoma espinocelular de mucosa oral foi mais incidente em homens e na faixa etária de 50 a 70 anos para ambos os sexos (Figuras 1, 2 e 3). Nos trinta casos propostos para este estudo, dois casos de leucoplasia com displasia severa compatível com carcinoma *in situ*

(20%) foram positivos para presença de HPV 16/18 (Tabela 1 e Figura 4D). As reações foram consideradas positivas quando o controle positivo apresentava células com núcleos castanhos (Figura 4A), o controle negativo contendo células com núcleos azuis (Figura 4B) e o controle de tecido normal negativo (Figura 4C).

DISCUSSÃO

No presente estudo, observou-se a maior incidência de lesões malignas de mucosa oral em homens e na

faixa etária de 50 a 80 anos (Figuras 1 a 3). Estudos epidemiológicos no Brasil tem demonstrado que a

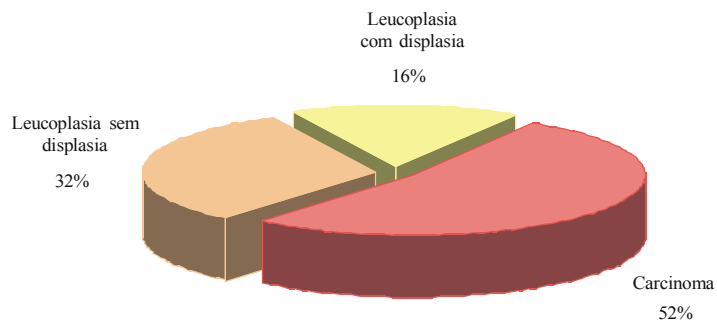


Figura 1 - Lesões orais em pacientes do sexo masculino.

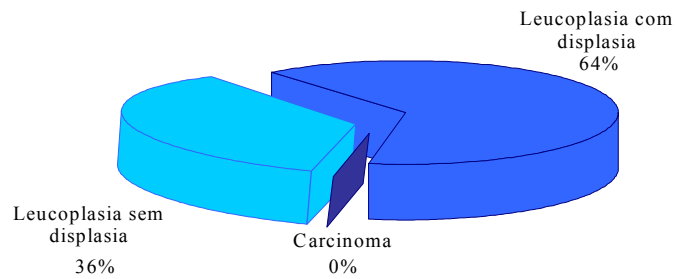


Figura 2 - Lesões orais nos pacientes do sexo feminino.

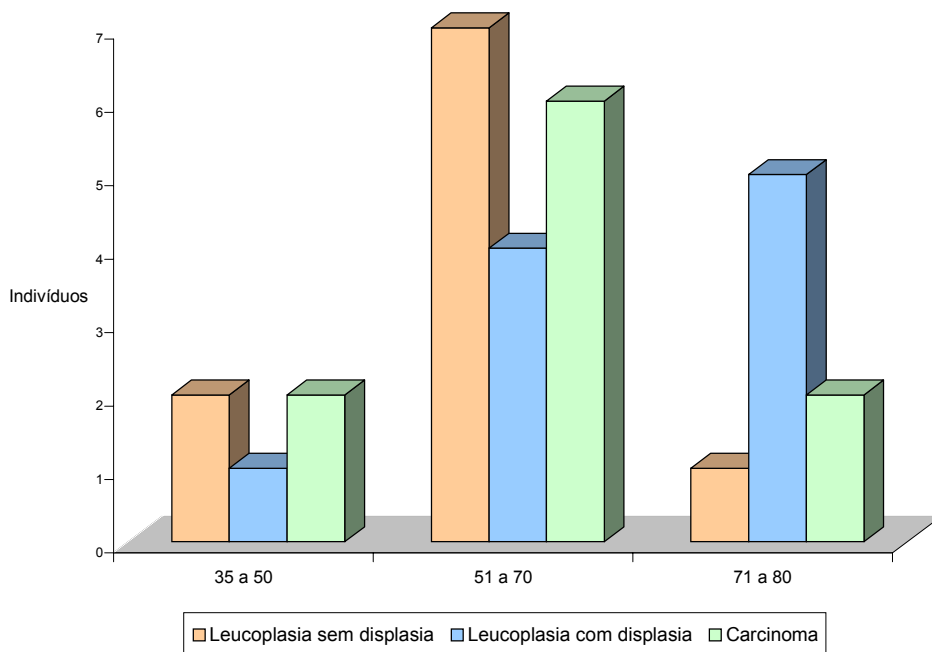


Figura 3 - Distribuição das lesões orais por faixa etária dos pacientes em estudo.

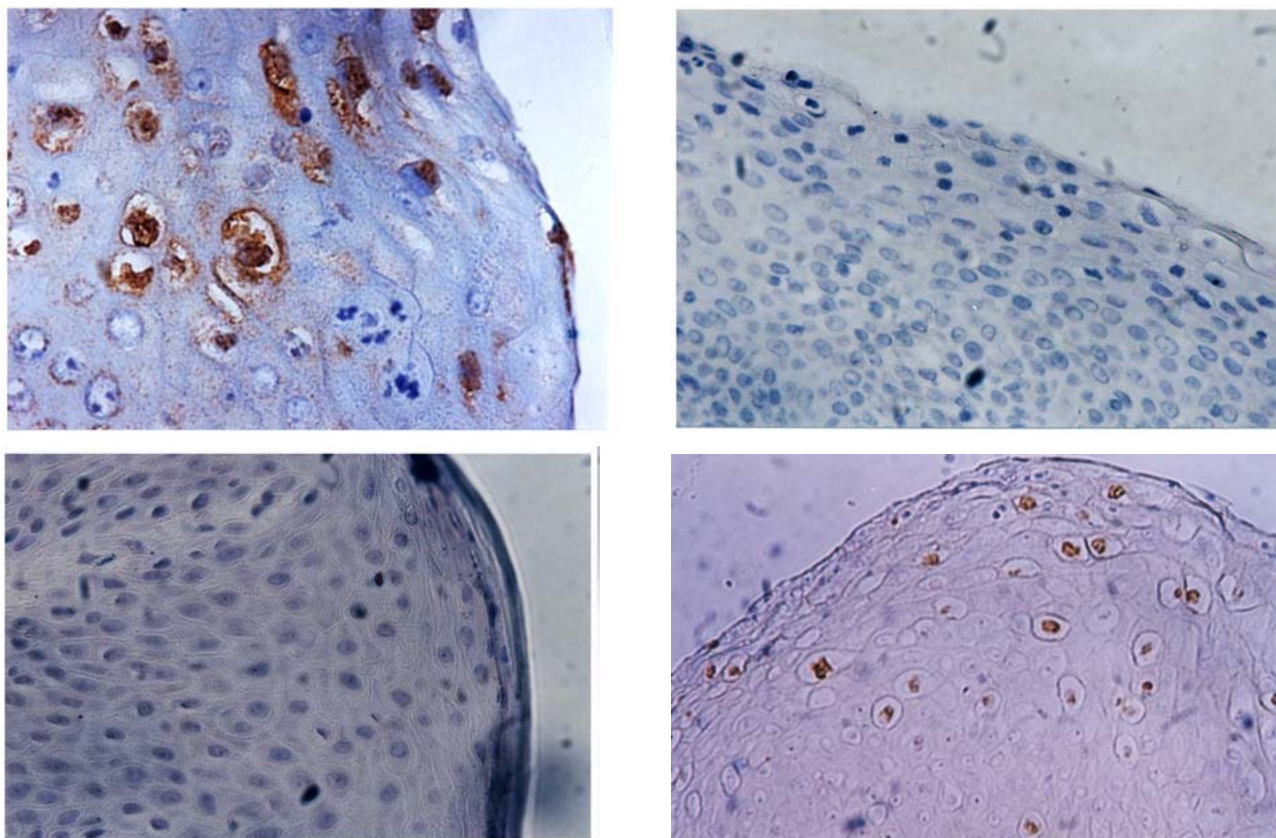


Figura 4 – A) Controle positivo da reação de HIS com sonda biotinilada para HPV 16/18, aumento de 1000 vezes. B) Controle negativo da reação de HIS para HPV 16/18. Aumento de 400 vezes. C) Controle de mucosa normal negativa (núcleos azuis) com sonda biotinilada para HPV 16/18, aumento de 400 vezes. D) Reação de HIS positiva com sonda biotinilada para HPV 16/18 (núcleos castanhos) em uma das biópsias com diagnóstico histopatológico de leucoplasia oral com displasia (LCD) . Aumento de 400 vezes.

Tabela 1 – Presença do papilomavírus humano (HPV) em lesões orais, através da reação de hibridização *in situ* (HIS).

Lesões orais	Presença de HPV		Ausência de HPV		Total
	nº	%	nº	%	
LSD	0	0	10	100	10
LCD	2*	20	08	80	10
CEI	0	0	10	100	10
Total					30

LSD = Leucoplasia sem displasia; LCD = Leucoplasia com displasia; CEI = Carcinoma espinocelular invasivo.

* HPV amplo espectro e 16/18 em indivíduo com displasia severa compatível com carcinoma *in situ*.

incidência de câncer oral é cerca de cinco vezes maior nos homens e numa faixa etária mais tardia para ambos os sexos, variando de 35 a 97 anos e idade média de 59 anos^{1 4 10}.

A leucoplasia é uma denominação clínica de lesões orais com aspectos histopatológicos com padrões e características microscópicas heterogêneas, variando de hiperqueratose benigna ao carcinoma espinocelular invasivo^{28 33 34}. No presente estudo foi detectada a presença do HPV em duas lesões orais com diagnóstico

histopatológico de lesão com displasia severa (Tabela 1). Estudos recentes demonstram a participação dos tipos de HPV anogenitais de alto risco em lesões pré-malignas e malignas de mucosa oral com resultados entre 11% a 80%, na dependência do método empregado^{6 7 9 11 18 19 21 26}. Entretanto, a prevalência média de HPV na mucosa oral²⁴ tem sido descrita entre 20 a 30%. No Brasil, Miguel et al²¹ obtiveram positividade para HPV 16 em 15% dos tumores de cabeça e pescoço.

O método de escolha para este estudo foi a reação de hibridização *in situ* (HIS) com sistema de amplificação de sinal *genpoint* (Figuras 4A e D). A presença de HPV na mucosa oral, utilizando a HIS como ferramenta molecular, tem apresentado resultados expressivos com porcentagem de detecção do DNA viral de 15% a 50%^{7 22 25}. A utilização da HIS na detecção de HPV é controversa. Esta reação sempre foi considerada uma metodologia de baixa sensibilidade quando comparada aos métodos mais sensíveis como a reação de polimerização em cadeia (PCR)^{22 32}. Entretanto, tem a vantagem de permitir a demonstração de informação genética específica dentro de um contexto morfológico e com grande aplicabilidade em materiais fixados e parafinizados³². De fato, no passado, a HIS apresentava pequena sensibilidade, permitindo a detecção de 20-100 cópias de HPV por célula (sondas radioativas) e de 200-800 cópias com sondas biotiniladas^{8 30}.

Recentemente, com o desenvolvimento de um novo sistema de amplificação, denominado *genpoint*, tornou-se possível a detecção mais sensível de HPV por HIS. O estudo de HPV em cultura de células demonstrou que a reação de HIS amplificada pelo sistema *genpoint* permite a detecção de 1-2 cópias virais¹⁷. Esse sistema contém o complexo de amplificação biotínil-tiramida, que permite melhorar o sinal de reação, garantindo forte coloração dos núcleos positivos e sensibilidade superior aos métodos de amplificação convencionais^{3 15 17 25}.

Os resultados permitem concluir que a presença dos tipos anogenitais de alto risco (HPV 16/18) encontrados em lesões malignas de mucosa oral sugere o envolvimento do HPV na transformação maligna celular de mucosa oral. Entretanto, outros estudos são necessários para o melhor entendimento da participação deste vírus no processo de carcinogênese oral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Araujo-Filho VJ, De Carlucci D, Sasaki SU, Montag E, Azato Cordeiro AC, Ferraz AR. Incidence of oral cancer profile at a general hospital in São Paulo. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo* 53:110-113, 1998.
2. Banoczy, J. Clinical and histopathological aspects of premalignant lesions. In: Van der Waal I, Snow GB (eds) *Oral Oncology*, 1st edition. The Hague: Martinus Nijhoff. p.13-18, 1984.
3. Birner P, Bachiarty B, Dreier B, Schindl M, Joura EA, Breitenecker OG. Signal-amplified colorimetric *in situ* hybridization for assessment of human papillomavirus infection in cervical lesions. *Modern Pathology* 14:702-709, 2001.
4. Carvalho MB, Lenzi CN, Lehn AS, Fava A, Amar JL, Kanda F, Walder MB, Menezes AS, Franzi MR, Magalhães AO, Curioni R, Marcel S, Szeliga J, Sobrinho A, Rapoport A. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. *Revista da Associação de Medicina Brasileira* 47:208-214, 2001.
5. Chang F, Syrjänen S, Kellokoski J, Syrjänen K. Human papillomavirus (HPV) infection and their association with oral disease. *Journal Oral. Pathology and Medicine*, 20:305-417, 1991.
6. D'costa J, Saranath D, Dedhia P, Sanghvi V, Mehta AR. Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India. *Oral Oncology* 34:413-420, 1998.
7. Donofrio V, Lo Muzio L, Mignogna M D, Troncone G, Staibano A, Boscaino A, De Rosa G. Prognostic evaluation of HPV-associated precancerous and microinvasive carcinoma of oral cavity: combined use of nucleolar organizer regions (AgNOR) proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Oral Oncology and European Journal of Cancer* 31B: 174-180, 1995.
8. Faulkner-Jones BE, Bellomario VM, Borg AJ, Orzeszko K, Garland SM. Detection and typing of human papillomavirus using Vira Type *in situ* hybridization kit: comparison with a conventional dot blot technique. *Journal Clinical Pathology* 43: 913-917, 1990.
9. Fornatora M, Jones AC, Kerpel S, Freedman P. Human papillomavirus-associated oral epithelial dysplasia (koilocytic dysplasia): an entity of unknown biologic potential. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics* 82:47-56,1996.
10. Gervasio OL, Dutra RA, Tartaglia SM, Vasconcelos WA, Barbosa A, Aguiar MC. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Brazilian Dental Journal* 12:57-61, 2001.
11. Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gonzalez-Moles S, Martinez I, Ceballos A, Nogales F. Detection of HPV DNA by *in situ* hybridization in benign, premalignant and malignant lesions of the oral mucosa. *Bulletin du Groupement International pour la Recherche Scientifique en Stomatologie & Odontologie* 37:79-85,1994.
12. Kashima HK, Levin SL, Kutcher M, Kessis T, De Villiers EM, Shah K. Human Papillomavirus in squamous cell carcinoma, leukoplakia, lichen planus and clinically normal epithelium of oral cavity. *Annals of Otolaryngology and Laryngology* 99:55-61, 1990.
13. Kowalski LP, Carvalho AL. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. *Oral Oncology* 37:94-98, 2001.
14. Kowalski LP, Franco EL, Torloni H, Fava AS, De Andrade Sobrinho, Ramos G, Oliveira BV, Curado MP. Lateness of diagnosis of oral and oropharyngeal carcinoma: factors related of the tumor, the patient and health professionals. *European Journal Cancer B Oral Oncology* 30:167-173, 1994.
15. Levenson C, Watson R, Sheldon EL. Biotinylated psoralen derivated for labeling nucleic acid hybridization probes. *Methods in Enzymology* 184: 577, 1990.
16. Liu SC, Klein-Szanto AJP. Markers of proliferation in normal and leucoplakic oral epithelia. *Oral Oncology* 36:145-151, 2000.
17. Lizard G, Demares-Poulet MJ, Roignot P, Gambert P. *In situ* hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells, using catalyzed signal amplification system:Genpoint. *Diagnostic Cytopathology* 24:112-6, 2001.
18. Lo Muzio L, Mignogna MD, Staibano S, De Vico G, Salvatore G, Damiano S, Bucci E, Procaccini M, Mezza E, De Rosa G. Morphometric study of nucleolar organizer regions (AgNOR) in HPV-associated precancerous lesions and microinvasive carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncology* 33: 247-259, 1997.
19. Mao EJ. Prevalence of human papillomavirus 16 and nucleolar organizer region counts in oral exfoliated cells from normal and

- malignant epithelia. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 80:320-329, 1995.
20. Mcglennen R.C. Human papillomavirus oncogenesis. *Clinics in Laboratory Medicine* 20: 383-406, 2000.
 21. Miguel RE, Villa LL, Cordeiro AC, Prado JC, Sobrinho JS, Kowalski LP. Low prevalence of human papillomavirus in a geographic region with a high incidence of head and neck cancer. *American Journal Surgery* 176:428-429, 1998.
 22. Miller CS. Herpes simplex virus and Human papillomavirus infection of the oral cavity. *Seminars in Dermatology* 13:108-117, 1994.
 23. Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology* 91:622-635, 2001.
 24. Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics* 82:57-68, 1996.
 25. Nielsen H, Norrild B, Vedtofre P, Praetorius F, Reibel J, Holmstrup P. Humana Papilomavirus in oral premalignant lesions. *Oral Oncology and European Journal of Cancer* 32B: 264-270, 1996.
 26. Palefsk JM, Silvermam S, Abdel-Salaam M, Daniles T, Greenspan JS. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papilomavirus type 16. *Oral Pathology Medicine* 24:193-197, 1995.
 27. Regezi JÁ, Sciubba JJ. White lesion in 2nd edittion. *In: Oral Pathology*. Saunders, Philadelphia, PA p.93-195, 1993.
 28. Sand L, Jalouli J, Larsson PA e Hirsch JM. Human papillomaviruses in oral lesions. *Anticancer Research* 20: 1183-1188, 2000.
 29. Scully C, Field J, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma(SCCHN):1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cicle control. *Oral Oncology* 36: 256-263, 2000.
 30. Syrjanen S, Partnen P, Mantatyjarvi R, Syrjanen K. Sensitivity of in situ hybridization techniques using biotin-??? 35S-labeled human papillomavirus (HPV) DNA probe. *Journal Virology and Methods*, 19: 225-238, 1988.
 31. Syrjanen SM. Human Papillomavirus infection in the oral cavity. *In: Syrjanen KJ, Gissmann L, Koss LG (eds) Papillomaviruses and Human Disease*. Heidelberg: Springer-Verlag. p.104 -137, 1987.
 32. Unger ER. *In situ* diagnosis of human papillomavirus. *Clinics in Laboratory Medicine* 20: 289-301, 2000.
 33. Van der Waal J, Schepmam KP, Van der Mey EH. A modified classification and staging system for oral leukoplakia. *Oral Oncology* 36: 264-266, 2000.
 34. Verbin RS, Bouquot JE, Guggenheimer J, Barnes LP, Peell L. Cancer of the oral cavity and orophrynx. *In: Barnes L (ed) Surgical pathology of the head and neck*. M. Dekker, New York, p 303-401, 1993.
 35. Zur Hausen H: Papillomavirus causing cancer: Evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis. Review. *Journal National Cancer Institute* 92:690-699, 2000