



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

DENNYS RAMON DE MELO FERNANDES ALMEIDA

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE P16, CICLINA D1 E KI67 EM LESÕES
ORAIS**

FORTALEZA

2014

DENNYS RAMON DE MELO FERNANDES ALMEIDA

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE P16, CICLINA D1 E KI67 EM LESÕES
ORAIS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Tropical.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

FORTALEZA

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

A444e Almeida, Dennys Ramon de Melo Fernandes.
Expressão imunoistoquímica de p16, ciclina d1 e ki67 em lesões orais / Dennys Ramon de Melo Fernandes Almeida. – 2014.
66 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Mestrado em Patologia, Fortaleza, 2014.

Área de Concentração: Patologia Tropical.

Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves.

1. Papillomavirus Humano 16. 2. Papillomavirus Humano 18. 3. Neoplasias Bucais. 4. Genes p16. 4. Imuno-Histoquímica. 5. I. Título.

CDD 616.99431

DENNYS RAMON DE MELO FERNANDES ALMEIDA

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE P16, CICLINA D1 E KI67 EM LESÕES
ORAIS**

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a Dr^a Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. José Eleutério Júnior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Eveline Turatti
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Deus;
A meus Pais, Jairo e Eunice;
A meu irmão, Eduardo Fernandes.

AGRADECIMENTOS

A CAPES, por me conceder apoio financeiro com a manutenção da bolsa auxílio durante o curso de mestrado.

Ao programa de pós-graduação em patologia, pela oportunidade de participar deste curso enriquecedor.

Aos professores participantes da banca, pelas valiosas contribuições ao trabalho.

A todos os meus contemporâneos de pós-graduação, especialmente ao Paulo Goberlanio Barros Silva, pela revisão estatística realizada no presente trabalho.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Ana Paula Negreiros Nunes Alves, por toda a orientação prestada ao longo do desenvolvimento desta dissertação, da qual me orgulho muito em tê-la como companheira de pesquisas.

Aos alunos de iniciação científica, Geraldo e Jéssica pelas horas dedicadas a execução do presente trabalho.

A todos que torceram pelo desfecho de sucesso desta pesquisa.

*“O mediocre discute pessoas,
o comum discute fatos,
o sábio discute idéias.”*

(Provérbio Chinês)

RESUMO

O p16 é um gene supressor de tumor amplamente estudado nas lesões associadas ao Papilomavírus Humano (HPV) visto que sua superexpressão é causada pela proteína viral E7. Além disso, esta molécula pode interagir com ciclina D1, importante regulador do ciclo celular, utilizado como marcador de agressividade tumoral. A expressão da proteína humana Ki67 está estreitamente relacionada com a proliferação celular e consequentemente com o grau de malignidade e prognóstico das neoplasias. O presente estudo objetivou avaliar a expressão imunoistoquímica de p16, ciclina D1 e Ki67 em lesões orais benignas exibindo coilocitose e no carcinoma de células escamosas (CEC) com ou sem evidência microscópica de infecção viral. Trata-se de um estudo retrospectivo, quantitativo e transversal realizado por meio do levantamento de blocos parafinados realizado no Laboratório de Patologia Bucal do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, no período de 2008 a 2013. Foram selecionadas 89 amostras agrupadas em: 25 hiperplasias fibroepiteliais com coilocitose (HFE/Col); 16 papilomas escamosos orais (PO); 28 carcinomas de células escamosas orais (CEC), subdividido entre pacientes abaixo de 50 anos (CEC-50) e acima de 50 anos (CEC+50). Utilizaram-se 20 casos de hiperplasias fibroepiteliais (HFE) como controle negativo. Na revisão histológica de todos os grupos, exceto no CEC+50, foram encontradas alterações citológicas consistentes com coilocitose ($p<0.001$). O sexo feminino foi o mais prevalente em toda a amostra não sendo, contudo, estatisticamente significante ($p=0.830$). As faixas etárias mais afetadas, em todos os grupos, foram a quarta e a quinta décadas de vida, no entanto, sem significância estatística ($p=0.701$). A localização anatômica mais frequente no HFE/Col foi o rebordo alveolar seguida da mucosa jugal, no PO o assoalho bucal e rebordo alveolar, no CEC abaixo de 50 anos a língua e palato e nos casos de CEC acima de 50 anos a língua, este último de forma significante ($p=0.015$). Todas as lesões orais benignas e o grupo de CEC-50 apresentaram elevada imunomarcação para p16 e ciclina D1, sendo estatisticamente significante em relação ao controle negativo (HFE) ($p<0.001$). A expressão quantitativa por Ki67 foi significantemente maior no CEC-50 em relação ao grupo controle (HFE) ($p<0.001$). Conclui-se que as lesões orais com coilocitose (papiloma, HFE/Col e CEC-50) apresentam positividade para p16 e ciclina D1 sugerindo possível associação da patogênese com o papilomavírus humano.

PALAVRAS-CHAVE: HPV, câncer oral, p16, ciclina D1 e Ki67.

ABSTRACT

P16 is a tumor suppressor gene widely studied in lesions associated with human papillomavirus (HPV) since its overexpression is caused by viral protein E7. Furthermore, this molecule can interact with cyclin D1, an important regulator of cell cycle used a marker of tumor aggressiveness. The expression of the human Ki-67 protein is strictly associated with cell proliferation and consequently the degree of malignancy and prognosis of tumors. This study aimed to evaluate the immunohistochemical expression of p16, cyclin D1 and Ki67 in benign oral lesions showing Koilocytosis and squamous cell carcinoma (CEC) with or without microscopic evidence of viral infection. This is a retrospective study, quantitative and cross carried by lifting paraffin blocks performed in Oral Pathology Laboratory of the course of the Federal University of Ceará Dentistry, from 2008 to 2013. We selected 89 samples grouped in 25 fibroepithelial hyperplasia with Koilocytosis (HFE / Col); 16 oral squamous papillomas (PO); 28 oral squamous cell carcinomas (CEC), subdivided among patients younger than 50 years (CEC-50) and above 50 years (CEC + 50). Were used in 20 cases of fibroepithelial hyperplasia (HFE) as a negative control. In histological review of all groups, except for CEC + 50, cytological changes were found consistent with Koilocytosis ($p < 0.001$). Females were the most prevalent in the whole sample is not, however, statistically significant ($p = 0.830$). The most affected age groups, in all groups, were the fourth and fifth decades of life, however, without statistical significance ($p = 0.701$). The most common anatomical location in the HFE / Col was the alveolar ridge followed by buccal mucosa in the mouth floor PO and alveolar ridge, the CEC under age 50 the tongue and palate and in cases of CEC over 50 years the tongue, this last significantly ($p = 0.015$). All benign oral lesions and the group of CEC-50 showed high immunostaining for p16 and cyclin D1, which was statistically significant compared to the negative control (HFE) ($p < 0.001$). The quantitative expression of Ki67 was significantly higher in CEC-50 in the control group (HFE) ($p < 0.001$). We conclude that oral lesions with Koilocytosis (papilloma, HFE / Col and CEC-50) are positive for p16 and cyclin D1 suggests a possible association of pathogenesis with human papillomavirus.

KEYWORDS: HPV, oral cancer, p16, cyclin D1 and Ki67.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1. QUADROS

Quadro 1- Especificidade, clone, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários empregados na amostra..... 34

2. FIGURAS

Figura 1- Mapa genômico do HPV-16. O genoma do HPV-16 é esquematicamente representado com a região precoce (E) e a região tardia (L). O promotor P97 (seta) e os sítios de ligação a E2 (círculos fechados) dentro da LCR anterior aos genes E6 e E7 são indicados (Adaptado de Zur Hausen, 2006)..... 17

Figura 2- Fotomicrografia de HFE/Col, PO, CEC e HFE corados em HE e, respectiva expressão imunoistoquímica de p16 e ciclina D1. Aumento de 400x. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal – Universidade Federal do Ceará 42

Figura 3- Fotomicrografia dos grupos HFE/Col (A), CEC-50 (B) e HFE (C), imunomarcados por Ki67. Aumento de 400x. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal- Universidade Federal do Ceará..... 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Dados em frequência absoluta e relativa da revisão histológica da presença de coilocitose de 89 lesões orais (p<0.001).....	37
Tabela 2: Distribuição por sexo de 63 lesões orais (p=0.830).....	37
Tabela 3: Distribuição etária de 46 lesões orais com presença de coilócitos (p=0.649).....	38
Tabela 4: Distribuição por localização anatômica da amostra de 69 lesões orais (p=0.019)	39
Tabela 5: Imunomarcação de p16 de 89 lesões orais com presença microscópica de coilocitose(p<0.001).....	40
Tabela 6: Imunomarcação para ciclina D1 de 89 lesões orais associadas a coilocitose (p<0.001).....	40
Tabela 7: Avaliação quantitativa de células imunomarcadas para p16 e ciclina D1 de 89 lesões orais com evidência microscópica de coilocitose (p<0.001).....	41
Tabela 8- Correlação de escores citopatológicos sugestivos de infecção viral e o perfil de celular (quantitativo) de imunomarcação celular para p16, ciclina D1 de 40 lesões benignas orais associadas a coilocitose	43
Tabela 9- Avaliação quantitativa de imunomarcação celular entre as zonas peritumorais e intratumorais de 28 lesões de CEC em relação aos escores citopatológicos sugestivos de infecção viral.....	43
Tabela 10- Imunomarcação para Ki67 de 59 lesões orais associadas a coilocitose.....	44
Tabela 11- Avaliação quantitativa do perfil de células imunomarcadas para Ki67 de 59 lesões orais.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDK: do inglês *cyclin dependente-kinase*, traduzido como quinase dependente de ciclina.

CKI: do inglês *cyclin dependente-kinase inibitor*, traduzido como inibidor de quinase dependente de ciclina.

CECP: carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

CEC ou CEO: carcinoma epidermóide oral ou carcinoma de células escamosas oral.

PO ou PEO: papiloma escamoso oral.

HFE/Col: hiperplasia fibroepitelial com presença de coilócitos.

CEC+50: carcinoma epidermóide oral em pacientes acima de 50 anos.

CEC-50: carcinoma epidermoide oral em pacientes com idade igual ou inferior a 50 anos.

HFE: hiperplasia fibroepitelial.

DAB: Diaminobenzindina.

DNA: do inglês, *Deoxiribonucleic Acid*, traduzido como ácido desoxirribonucleico.

HPV: do inglês, *Human Papillomavirus*, traduzido como papilomavírus humano.

IQ: Imunoistoquímica

p16: refere-se a proteína homônima (p16) expressa.

pRb: refere-se a proteína homônima (pRb) expressa.

Ciclina D1: refere-se à proteína homônima (cyclina D1) expressa.

Ki67: refere-se à proteína homônima (Ki67) expressa.

p53: refere-se a proteína homônima (p53) expressa.

E1, E2, E3, E4, E5, E6 e E7: do inglês, *early*, traduzido por proteínas de expressão precoce do HPV.

L1, L2, L3: do inglês, *late*, traduzido por proteínas de expressão tardia do HPV.

SABC: do inglês, *Streptoavidin-biotin complex*, traduzido como complexo streptoavidina biotina.

RNA: do inglês, *ribonucleic acid*, traduzido por ácido ribonucleico.

DST: sigla para denominar doenças sexualmente transmissíveis.

INCA: Instituto Nacional do Câncer.

kDa: Kilodáltons.

G1/S/G2: Letras representativas das fases de replicação celular.

HE: Hematoxilina-Eosina.

μ g: micrograma.

μ l: microlitro.

μ m: micrômetro.

NIC: sigla do sistema Bethesda para denominar os graus de lesão intraepitelial cervical.

PCR:do inglês, *Polymerase Chain Reaction*, traduzido por Reação de Cadeia Polimerase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 HPV: genoma e proteínas virais, classificação e patogênese da infecção.....	16
2.2 Efeitos Citopáticos do HPV.....	22
2.3 O HPV em lesões benignas de cavidade oral.....	23
2.4 O HPV no carcinoma epidermoide oral.....	25
2.5 Imunoexpressão de p16 e cilcina D1.....	26
2.6 Imunoexpressão de Ki67.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
4. METODOLOGIA.....	30
4.1 Caracterização do Estudo.....	30
4.2 Casuística.....	30
4.3 Cálculo Amostral.....	30
4.4 Critérios de inclusão e exclusão da amostra.....	31
4.5 Análise Clínicopatológica da amostra.....	31
4.6 Expressão Imunoistoquímica.....	32
4.6.1 Preparo do material/Protocolo da reação.....	32
4.6.2 Captura das imagens.....	33
4.6.3 Densidade de marcação epitelial.....	33
4.7 Análise estatística.....	34
4.8 Aspectos éticos e legais.....	35
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO.....	45
7. CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICES.....	64

1 INTRODUÇÃO

Diversas lesões orais são identificadas com base nas alterações histopatológicas observadas na microscopia ótica de rotina, contudo a imunoistoquímica (IQ) tem sido usada para aperfeiçoar os recursos diagnósticos elevando a sensibilidade dos resultados da histopatologia convencional. Quando se analisam lesões com presença de coilocitos o emprego da IQ mostra-se importante para indicar se os tecidos analisados possuem traços de moléculas expressas em infecções virais (CHENEVERT e CHIOSEA, 2012).

Nesse sentido a etiopatogênese do CEC oral que já é explicada por diversos fatores como fumo, álcool e radiação solar (lesões em lábio) tem sido também associada a infecções pelo papilomavírus humano. Os pesquisadores se baseiam em achados histopatológicos indicativos de infecção viral como a coilocitose para então submeter às amostras a diversos testes para confirmar a presença do vírus (ZHAO et al., 2012; WEISS et al., 2012; UKPO et al., 2012).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) notificou, no ano de 2014, o CEO como o quinto lugar geral dos tipos de câncer entre a população masculina. Nas regiões Nordeste (7 casos/100 mil) e Sudeste (15 casos/100 mil) ocupa a quarta posição. Na Região Centro-Oeste (8 casos/100mil) está na quinta colocação. Os principais fatores de risco são o fumo, o etilismo e infecções orais pelo HPV. A despeito dos esforços e altos investimentos na busca de marcadores biológicos, há muito a ser descoberto, e o que se tem de concreto e de fácil acesso são os dados clínicos e histopatológicos das lesões. Segundo Almeida et al (2011), o uso da Imunoistoquímica tem otimizado o diagnóstico de diversas lesões e auxiliado no entendimento do comportamento biológico de tumores benignos e malignos.

O papilomavírus humano é um vírus não envelopado de ácido desoxirribonucelio (DNA) pertencente à Família Papillomaviridae o qual infecta células epiteliais escamosas (DOOBAR et al, 2012). No exame histopatológico a coilocitose apresenta-se como o aspecto morfológico mais sugestivo da presença do vírus, contudo essa e outras alterações são apenas indicativas de infecção viral sem que se possa confirmar a sua presença (LEWIS et al, 2012).

Na boca as principais lesões associadas ao papilomavírus humano são o papiloma escamoso oral, a verruga vulgar, a hiperplasia epitelial focal (papiloma multifocal) e o

condiloma acuminado. Os subtipos virais responsáveis por essas formas clínicas de apresentação são diversos e o comportamento biológico, embora na maioria benigno, é variável, podendo em alguns casos desenvolver-se o câncer a partir de lesões pre-existentes de HPV (DOORBAR et al., 2007; CHENEVERT e CHIOSEA, 2012).

As técnicas utilizadas para rastreamento do HPV são a reação em cadeia da polimerase (PCR) e a hibridização *in situ* (ISH). O PCR quantifica a carga viral do papilomavírus e pode ser usado também para diferenciar os diversos subtipos existentes, porém não é rotineiramente disponível na maioria laboratórios devido o alto custo (EL-MOFTY e PATIL, 2006).

Alguns testes de PCR são aprovados para uso clínico, porém o método exige um alto nível de habilidades técnicas e instalações de laboratório especiais para evitar contaminação. Quando aplicado aos extratos feitos a partir de amostras de biópsias frescas-congeladas, a sensibilidade é mais elevada, embora o uso para blocos parafinadas também seja viável (FAKHRY, 2006; DAYYANE et al., 2010).

A detecção do vírus com ISH fornece evidências de genomas virais por ácido ribonucleico mensageiro (RNAm) ou ácido desoxirribonucleio (DNA) viral presente no núcleo de lesões ativas sendo altamente específica, embora menos sensível que o PCR (ROBINSON et al., 2010).

Junto com o diagnóstico do HPV a detecção da proteína p16 é frequentemente utilizada como um marcador indireto associado a oncoproteínas virais (E5, E6 e E7), essa imunomarcação ajuda a diferenciar entre as lesões ativas e as formas latentes tendo em vista que a imunoexpressão desta proteína só ocorre na forma ativa do HPV (EL-MOFTY, ZHANG e DAVILA, 2008).

O p16 é um gene supressor de tumor, que inibe quinase dependente de ciclina. Na presença do HPV ativo, a proteína do retinoblastoma hipofosforilado (pRb) liga-se a oncoproteína E7, permitindo a transcrição do fator ativador E2F e parando o feedback negativo em p16, dessa forma a molécula se acumula na célula sem que a mesma possa exercer sua função adequadamente (KIM et al., 2007; DAYYANE et al., 2010).

O uso na rotina diagnóstica do p16 é bastante acessível e seus custos técnicos são estimados em 2-16 vezes menores do que outros testes específicos de HPV (LEWIS, 2012). Contudo têm sido relatados dificuldades em afirmar que o p16 por si só represente o diagnóstico presuntivo para a infecção por HPV em boca, pois não há consenso sobre a definição de uma taxa quantitativa de superexpressão de p16 variando entre 5% a 75%

(SMEETS et al., 2007; LEWIS, 2012). Isto pode ser problemático, pois a falta de padronização leva a interpretações duvidosas sobre os espécimes p16-positivos e negativos.

Normalmente não somente o p16 é empregado nos testes de imunoistoquímica em amostras com alterações citopatológicas de infecção viral, mas um panorama de marcadores tem sido adicionado como o p53, Ki67, ciclina D1, p21 dentre outros. O intuito principal é determinar o prognóstico de lesões potencialmente malignas e de tumores malignos em boca associados ao HPV (LANGENDIJK e PSYRRI, 2010; GAO et al., 2013).

O anticorpo monoclonal anti-Ki67 têm mostrado relação com o grau histológico de anaplasia e o comportamento biológico dos tumores, sugerindo que a expressão deste marcador, forneça informações prognósticas em alguns tipos de carcinomas de pele e membranas mucosas (KONG et al., 2006; LAMBERT et al., 2006). É descrito que a taxa de imunoexpressão é maior em tumores epiteliais como o CEC (LIANG, et al., 2006).

Além deste, a ciclina D1 também tem sido usada como marcador de lesões tumorais. Esta proteína pertence a uma família de ciclinas altamente conservada, cujos membros são caracterizados por aumentar seus intervalos de concentração ao longo do ciclo celular (FRIEDLAND et al., 2012). As ciclinas funcionam como reguladores das quinases dependentes de ciclina ou CDKs. A ciclina D1 atua como uma subunidade reguladora de um complexo formado com CDK4 ou CDK6 e a sua atividade é necessária para G1 / S de transição do ciclo da célula. Além disso, esta proteína também tem mostrado ser capaz de interagir com Rb, que hiperregula a expressão de ciclina D1 (KIM et al., 2007). Por seu metabolismo estar associado a p16 a imunoexpressão simultânea destas moléculas tem tido interesse particular em espécimes que apresentam coilocitos no exame histopatológico (KLUSSMANN et al., 2009).

Diante do exposto o presente trabalho se propôs a realizar um estudo de correlação entre a expressão immuoistoquímica de p16, ciclina D1 e Ki67 em lesões orais com presença de coilocitose detectada no exame histopatológico de rotina.

2 Revisão da literatura

2.1 HPV: genoma e proteínas virais, classificação e patogênese da infecção.

Os papilomavírus são pequenos vírus de DNA, não envelopados, classificados na família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus* que podem ser encontrados no epitélio humano e de muitas espécies de animais, incluindo pássaros, répteis e mamíferos, e são altamente específicos para os respectivos hospedeiros (KUO et al., 2008).

O HPV é um vírus cujo genoma constitui-se de uma dupla-hélice de DNA circular, com cerca de 8.000 pares de bases (UOKPO et al., 2011). Foram reconhecidas três regiões em seu genoma: uma região precoce, que compreende seis genes (E1, E2, E4, E5, E6 e E7) com funções regulatórias relacionadas à persistência do genoma na célula, replicação do DNA e ativação do ciclo lítico; uma região tardia, que codifica duas proteínas estruturais (L1 e L2), e uma região não-codificante conhecida como região de controle de *lócus* (LCR) que contém a origem de replicação viral e os elementos transcricionais que regulam a expressão dos genes do HPV (UOKPO et al., 2011; WEISS et al., 2012) (Figura 1).

Os efeitos das proteínas E6 e E7 têm sido intensivamente estudados e podem atuar juntas produzindo eficiente imortalização de células epiteliais humanas, evidenciando assim, o papel do HPV na tumorigênese. Estudos individuais têm mostrado também que células epiteliais orais humanas podem ser imortalizadas por alguns tipos de HPVs de alto risco (OKORKE et al., 2012).

A proteína E6 do HPV de alto risco atua como um fator importante na progressão de lesões potencialmente malignas para o câncer por possuir ação anti-apoptótica e carcinogênica. A proteína E6 interage com a proteína supressora de tumor p53, teoricamente, provocando o sequestro funcional de p53 e promovendo sua degradação pela via proteolítica dependente da ubiquitina (OKORKE et al., 2012). A atividade da telomerase em células humanas normais também pode ser induzida pela proteína E6, e sabe-se que esta atividade é crítica para a senescência celular (ZHAO et al., 2012).

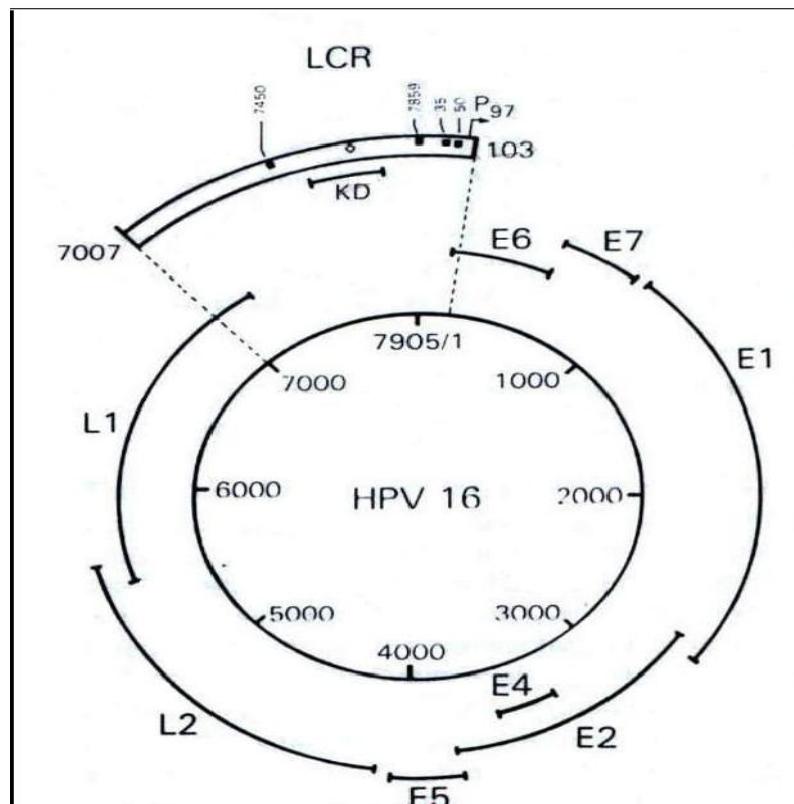


Figura 1: Mapa genômico do HPV 16. O genoma do HPV 16 é esquematicamente representado com a região precoce (E) e a região tardia (L). O promotor P97 (seta) e os sítios de ligação a E2 (círculos fechados) dentro da LCR anterior aos genes E6 e E7 são indicados.
(Adaptado de Zur Hausen, 2006).

A fosfoproteína nuclear p53 possui como principal função a ação supressora de tumor. Essa função é exercida através de mecanismos regulatórios do ciclo celular que impedem a replicação do DNA quando este apresenta algum tipo de dano. Tais mecanismos levam a uma parada do ciclo celular na fase G1 de modo que haja tempo de reparo das alterações existentes. Quando este reparo não é possível, a célula aciona mecanismos que resultam na sua morte por apoptose. Assim, quando a proteína E6 liga-se a p53, induzindo sua rápida degradação proteolítica, faz com que a replicação do DNA ocorra normalmente independente do dano que ele apresente, resultando na instabilidade genômica (MARUR et al., 2010).

A oncoproteína viral E7, assim como a proteína E6, também atua como um importante fator na progressão do tumor. Esta se associa ao produto do gene do retinoblastoma (pRb), um gene supressor tumoral importante no controle negativo do crescimento celular. A ligação de E7, de HPV de alto risco, à pRb, induz a liberação do fator de transcrição E2F que ativa a transcrição de genes promotores da progressão do ciclo e proliferação celular. A expressão de E7 de HPVs de alto risco favorece a integração do DNA viral ao DNA da célula hospedeira, promovendo a instabilidade genômica e aumentando a mutagenicidade de carcinógenos químicos por mecanismos ainda desconhecidos (KIM et al., 2007; DAYYANI et al., 2010)

Os genes tardios L1 e L2 apresentam sequências altamente conservadas em todos os papilomavírus e codificam proteínas do capsídio. Após sintetizadas, estas proteínas são direcionadas para o núcleo celular onde as partículas virais são formadas. Estas proteínas virais são expressas exclusivamente em infecções produtivas, ocorrendo somente em queratinócitos diferenciados (ANG et al., 2010).

Os HPVs são classificados taxonomicamente e subdivididos em subtipos por análise genômica e portanto, representam genótipos. O genoma de HPV é descrito como pertencendo a um tipo se as sequências nucleotídicas dos genes E6, E7 e L1 (isto é, cerca de 1/3 do genoma viral) apresentassem menos de 90% de homologia com os tipos previamente identificados. Um subtipo que compartilhasse uma homologia entre 90-98 % nestas regiões são considerados de subtipos idênticos (HOLZINGER et al., 2012).

Clinicamente a infecção pelo HPV causa um amplo espectro de proliferações cutâneas, muco-cutâneas e da mucosa e podem ser agrupados em três grupos patológicos (DAYYANI, 2010):

- HPVs cutaneotrópicos que afetam regiões não-genitais. Estes subtipos estão quase sempre associados a lesões verrucosas benignas;
- Os subtipos cutaneotrópicos que produzem lesões clínicas em pacientes com epidermodisplasia verruciforme, uma condição hereditária rara autossômica recessiva, onde um defeito na imunidade mediada por células T torna os pacientes suscetíveis a lesões provocadas por alguns tipos de HPV. Esta condição é caracterizada por uma verrucosidade extensa, a partir dos 8 anos de idade e cerca de 50 % dos pacientes desenvolvem carcinoma de células escamosas em sítios cutâneos expostos a luz solar a partir dos 30-40 anos. Estes vírus raramente estão associados ao desenvolvimento de neoplasias em pacientes sem a doença.

- Subtipos mucoso-genitotrópicos, que infectam especialmente a genitália externa ou a mucosa da genitália, boca ou laringe. Deste grupo fazem parte cerca de 40 tipos de vírus.

A mesma correlação entre os tipos de HPV mucosos e características clínico patológicas específicas são observadas tanto na região de cabeça e pescoço como no epitélio cervical uterino, embora a infecção pelo HPV seja menos prevalente em lesões dos tratos digestivos e respiratórios superiores que nas correspondentes lesões cervicais (ANG et al., 2010; CHENEVERT e CHIOESA, 2012).

Os HPVs mucosos são tipicamente divididos em dois grupos: grupos de baixo risco e de alto risco. A definição original de tipos específicos de HPV como vírus de alto risco foi baseada em sua presença frequente no câncer anogenital e cervical (BEGUM e WESTRA, 2008). Nos anos seguintes, a determinação de diferentes propriedades para ambos os grupos permitiu uma melhor definição. Isto se tornou aparente quando foi demonstrado que vírus de alto risco eram capazes de imortalizar queratinócitos humanos *in vitro* e os vírus de baixo risco não apresentaram esta propriedade (DAYYANI et al., 2010).

As observações subsequentes sobre a ligação de oncoproteínas de HPV de alto risco a p53 e pRb também foram parâmetros importantes na distinção entre os grupos, já que as proteínas dos HPVs de baixo risco não apresentavam esta característica. Entretanto, a indução de aberrações cromossômicas como consequência da ação das oncoproteínas dos subtipos de HPV de alto risco sobre os mecanismos de controle do ciclo celular emergiu como a mais importante distinção funcional entre estes dois grupos. Devido a estas propriedades, vírus de alto risco são capazes de contribuir diretamente para a progressão maligna de células infectadas latentamente e podem atuar como carcinógenos solitários, no câncer anogenital (KLUSSMAN et al., 2008).

Tipos oncogênicos de HPVs, tais como o HPV 16, são associados com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, enquanto tipos de HPVs de baixo risco, tais como o HPV 6, são ligados a papilomas de cabeça e pescoço (CHARFI et al., 2008). Os HPVs, principalmente o 16, são também encontrados em queratinócitos e displasias da laringe e da cavidade oral, que são conhecidas como lesões pré-cancerosas (GAO et al., 2013).

O potencial de malignidade é um importante fator de progressão da infecção. Se a infecção é por vírus de baixo risco, ela ou produzirá verrugas ou será eliminada, dependendo de fatores de risco e do sistema imune. Se a infecção é por um tipo intermediário ou vírus de alto risco e o sistema imune do paciente é competente, a infecção provavelmente será eliminada. Aqueles pacientes que são infectados por um vírus contendo uma variante mais

agressiva e que têm cofatores genéticos, ambientais e sistema imune predisponentes, desenvolvem infecções genitais persistentes que resultam em lesões precursoras que podem progredir para câncer se não forem identificadas e tratadas (EL-MOFTY e ZHANG, 2008).

Muitos autores apontam o HPV 16 como o mais frequentemente associado ao CEO (carcinoma epidermóide oral) através de estudos por PCR. As taxas de detecção variam de 60% a 90%. Além do subtipo 16, o HPV-18 é frequentemente encontrado, porém em menor quantidade (LEEFLANG et al., 2008)

A história natural das infecções pelo HPV não está ainda completamente estabelecida em cavidade oral. Como esse vírus não se propaga em cultura de células pelos métodos convencionais, existem muitos obstáculos à realização de estudos mais aprofundados sobre seus mecanismos de interação com a célula hospedeira. Acredita-se que as anormalidades citológicas e histopatológicas observadas em biópsias embora não sejam conclusivas são fortemente indicativas de infecção por HPV (FARSHADPOUR et al., 2011).

Os modelos estabelecidos para o mecanismo de evolução de lesões potencialmente malignas para lesões malignas em sítios genitais são facilmente aplicados também à cavidade oral. O epitélio escamoso do trato genital inferior feminino e da cavidade oral, embora bem distintos anatomicamente, compartilham muitas características em comum com relação a alterações neoplásicas precoces e aos efeitos citológicos sugestivos de infecção pelo HPV (HONG et al., 2010; FARSHADPOUR et al., 2011).

O epitélio normal da cérvix uterina humana é constituído por uma camada basal de células pequenas, redondas e imaturas. À medida que a célula amadurece, ela se move para camadas mais superficiais da epiderme e pára de se dividir, adquire mais citoplasma, produz mais queratina, desenvolve picnose nuclear, torna-se anucleada e finalmente descama. As neoplasias intraepiteliais cervicais (NICs) são caracterizadas por proliferação atípica de células escamosas, com distúrbio de maturação e polaridade (ELEUTÉRIO JÚNIOR et al., 2007).

Ao infectar a célula epitelial, o HPV realiza o seu processo de replicação inicial, induzindo à proliferação celular que geralmente regide espontaneamente. O vírus pode também persistir em algumas células em estado de latência por tempo indeterminado sem produzir novas partículas infecciosas e sem destruir as células infectadas, ou pode progredir para uma infecção crônica do tipo produtiva, podendo resultar na transformação maligna da célula. Durante o estado de latência viral, nem todos os genes virais são expressos, podendo

ocorrer reativação transitória ou resultar na infecção crônica do tipo produtiva (NICHOLS et al., 2009; WESTRA, 2009; WESTRA 2012).

Foi demonstrado que durante o processo de integração, grandes porções do DNA viral podem ser deletadas, mas os genes E6 e E7 estão sempre presentes e transcripcionalmente ativos, de forma que as células tumorais expressam seus produtos em grandes quantidades e estes parecem estar diretamente envolvidos no processo de transformação maligna da célula infectada (PREUSS et al., 2008). A integração pode resultar na deleção total ou parcial dos genes E4, E5 e L2. A região L1 também pode ser parcial ou totalmente deletada durante a integração (LICITRA et al., 2006).

Existem muitas similaridades entre oncogênese do colo uterino e oral e as mudanças induzidas pelo HPV na cérvix uterina podem também ser aplicadas em boca entretanto, a integração do HPV no DNA do hospedeiro não é o único fator que leva ao câncer oral (DAYYANI et al., 2010).

2.2 Os efeitos citopáticos do HPV

As infecções ativas de HPV podem apresentar alterações citológicas visualizadas no exame histopatológico de rotina. Podem-se citar a coilocitose, a disceratose, a papilomatose, a granulose, dentre outros. A coilocitose é caracterizada pela presença de grandes vacúolos perinucleares associados a degeneração vacuolar, porém ressalta-se que as celulas com esta alteração apresentam nitidamente a cromatina comprometida demostrando claramente alterações em nível nuclear. Alguns autores consideram os coilocitos um sinal patognomônico de infecção por HPV; entretanto, outros critérios para sugerir a infecção podem ser usados como células superficiais e intermediárias largas, bordas citoplasmáticas irregulares, zona perinuclear citoplasmática clara, por vezes binucleadas. Destaca-se, entretanto que, em geral, os coilocitos não são encontrados nos casos de infecção latente (JACYNTHO et al., 2006).

A presença destes achados citológicos depende do estágio da infecção. Vários estudos sobre o HPV encontraram coilocitose como efeito citopático mais frequente, quando estas amostras foram submetidas a testes de biologia molecular (PCR) encontrou-se DNA-HPV mostrando a forte associação entre a coilocitose e a presença do vírus nas células epiteliais avaliadas. Nicolau (2011) obteve 1.279 biópsias de 433 homens e relatou 23,53% de atipias coilocíticas em lesões benignas e próximo a 80% em lesões potencialmente malignas. Guidi (2010) avaliou 562 homens e encontrou, na

análise histopatológica, 33,2% de atipias coilocíticas em lesões benignas e aproximadamente 75% em lesões potencialmente malignas.

2.3 O HPV em lesões benignas de cavidade oral

2.3.1 Papiloma

É o tumor benigno que mais ocorre na mucosa bucal, na região de língua, lábio e palato mole, representa 2,5% de todas as lesões da boca, ocorre na mesma frequência entre homens e mulheres, atingindo mais da 3^a à 5^a década de vida. Clinicamente manifesta-se como um nódulo exofítico, indolor, podendo apresentar pequenas projeções digitiformes, semelhantes a dedos, dando um aspecto verrucoso, com superfície branca, vermelho-clara ou de coloração semelhante à mucosa adjacente, dependendo da quantidade de ceratina. Os pailomas são lesões únicas de crescimento rápido e medem menos de 1 cm (BRAGAGNOLO, ELI e HASS, 2010).

O quadro histopatológico é caracterizado por proliferação do epitélio escamoso estratificado ceratinizado com áreas centrais de tecido conjuntivo fibrovascular, que apresentam alterações inflamatórias dependendo da quantidade de trauma provocado pela lesão. Os coilócitos, células epiteliais claras alteradas pelo vírus, com núcleo pequeno e escuro (picnótico), muitas vezes são observados nas camadas superficial e espinhosa superior (KIM et al.,2007).

O diagnóstico diferencial deve ser feito entre o xantoma verruciforme, disceratoma verrucoso ou doença de Darier, e os tipos virais mais identificados no pailoma são o 6 e 11. O tratamento é a excisão cirúrgica removendo a base da lesão, tem um baixo índice de recorrência e mesmo sem tratamento adequado não existem relatos de malignidade ou disseminação para outras áreas (NAM, 2009)

2.3.2 Condiloma acuminado

O condiloma acuminado é uma lesão infecciosa, que se localiza na região anogenital, mas também ocorre na boca e laringe e compõe cerca de 20% de todas as Doenças Sexualmente Transmissíveis (DSTs) diagnosticadas, com seu período de

incubação variando de 1 a 3 meses após o contato com o HPV (NEVILLE, 2009). Clinicamente se caracteriza pela formação de múltiplos nódulos de coloração rósea, que acabam coalescendo, formando uma lesão exofítica, séssil, firme com projeções curtas e rombudas, tendo um crescimento variado de 1 a 1,5 cm e ocorrendo com maior frequência na área de mucosa labial, palato mole e freio lingual (CHARFI et al., 2008).

O tratamento mais empregado é a excisão cirúrgica onde a mesma faz o papel de biópsia e tratamento da lesão. O laser de CO₂ e o bisturi elétrico também têm sido utilizados, porém com certa cautela, uma vez que o vírus pode se disseminar em micro gotas aerossolizadas pela vaporização do tecido. (HOLFMAN, 2012).

O diagnóstico diferencial deve ser feito entre molusco contagioso, líquen plano, lesões mucosas da síndrome de Cowden, lesões da doença de Darier e manifestações bucais da doença de Crohn e a pioestomatite vegetante. (DAYYANE et al., 2010). Os tipos virais associados a esta lesão são o 6 e o 11, mas os tipos 2 e 53 também são observados (LASSEN, 2012).

2.3.4 Hiperplasia epitelial focal

A hiperplasia epitelial focal é uma proliferação induzida por vírus, localizada no epitélio escamoso oral, e foi descrita pela primeira vez (1894) em esquimós da Groelândia. Posteriormente, em 1965, foi relatada em latino-americanos e americanos nativos. Hoje se sabe que esse quadro clínico está presente em muitas populações e em diferentes grupos étnicos. O termo doença de Heck foi estabelecido em homenagem ao Dr. John Heck, que identificou o paciente com essa condição no Novo México, em 1961 (FERRARO et al., 2011).

Os locais mais propensos ao desenvolvimento dessa lesão são as superfícies ceratinizadas e não-ceratinizadas nas quais tem sido observada relação com dois tipos de papilomavírus humano: o HPV 32, com tendência a causar doença em pessoas de mais idade, e o HPV 13, que parece estar igualmente envolvido no desenvolvimento da doença, tanto em pacientes jovens quanto nos de idade mais avançada (FERRARO et al., 2011).

A doença de Heck é clinicamente caracterizada por lesões bem definidas, que podem ser únicas ou múltiplas, como nódulos ou pápulas, arredondadas ou planas, que frequentemente coalescem, e tamanho variando entre 0,1 e 1 cm de diâmetro. São

indolores em sua maioria, localizando-se principalmente nas mucosas jugal, labial, lingual, gengival e, com menor frequência, no assoalho bucal, palato mole e orofaringe (SANTOS et al.,2007).

Microscopicamente a hiperplasia epitelial na doença de Heck apresenta uma considerável e abrupta acantose focal. O espessamento do epitélio se estende para a superfície externa da lesão, com as cristas epiteliais da lesão se apresentando na mesma profundidade das cristas epiteliais normais adjacentes, sendo estas mais largas, frequentemente confluentes e, algumas vezes, em forma de "taco de golfe". Pode-se ainda observar alterações coilocíticas em alguns ceratinócitos superficiais semelhantes a outras infecções pelo HPV, bem como células mitosóides (células com núcleo alterado) que lembram uma figura de mitose (SAIUTE-GERONS et al., 2006).

O tratamento da hiperplasia epitelial focal varia desde o simples acompanhamento do caso, uma vez que a doença tende a regredir espontaneamente e/ou pode persistir por muitos anos, até o tratamento cirúrgico, que nesta situação fica restrito aos casos com comprometimento estético. Entretanto, existem alternativas para o tratamento, como crioterapia, laserterapia, cauterização e utilização de tratamentos tópicos, como ácido retinóico ou interferon (SANTOS et al.,2007).

2.4 O HPV no carcinoma epidermóide oral

Tradicionalmente na literatura científica o carcinoma epidermóide oral (CEO) está correlacionado ao uso do tabaco e/ou álcool ou uso do betel, mas existem pacientes que desenvolvem o CEO na ausência de exposição destes agentes (ALMEIDA et al., 2011).

Diversos estudos investigaram a importância do HPV nas lesões orais malignas, potencialmente malignas e em pacientes saudáveis, porém os resultados são contraditórios e inconclusivos quanto à prevalência do vírus (SHI et al., 2009; WEINBERGER et al., 2010; THAVARAJ et al., 2011; UKPO et al., 2012; WEISS et al., 2012).

Pode-se observar na maioria dos estudos, uma maior frequência do vírus em lesões malignas quando se compara com lesões potencialmente malignas e em tecidos saudáveis. Quanto ao grupo de pacientes saudáveis, também há fortes divergências, pois enquanto alguns autores não detectaram nenhum caso de infecção pelo HPV nesses pacientes (CHARFI et al.,2008; NICHOLS et al.,2009), outros observaram porcentagens

variáveis de infecção (HOLKINGER et al., 2012; JUNOR et al., 2012). Essas variações na prevalência são provavelmente devido a diferenças nas populações estudadas e nos métodos utilizados para a detecção do HPV.

Algumas evidências sugerem que os subtipos de HPV de alto risco estão envolvidos na carcinogênese oral: o DNA do HPV de alto risco foi identificado em carcinomas epidermóides orais e linhagens celulares derivadas dessas lesões onde os subtipos de alto risco, através de mecanismos envolvendo as oncoproteínas E6 e E7, podem manter-se integrados a linfonodos satélites responsáveis por metástases nodulares (QUON et al., 2013).

Os tumores HPV-positivos expressam as proteínas virais E6 e E7 inativando, respectivamente, p53 e pRb. A expressão da proteína p16 é subsequentemente elevada devido à perda do *feedback* negativo pRb (LIN et al., 2013). O p16 então inibe cyclinD1 - CDK4 / 6 (*cyclindependent cinase*), que são importantes reguladores para o ciclo celular para o progresso da fase G1 para a S (ADESTEIN et al., 2008). Com base nesse modelo molecular os estudos sobre o HPV tem se preocupado não somente em mostrar a presença do DNA viral (obtido por Captura Híbrida ou PCR) como também avaliar a imunoexpressão do p16 e ciclina D1 afim de predizer sobre o comportamento biológico dos tumores associados a este vírus.

2.5 Imunoexpressão de p16 e ciclina D1

O gene CDKN2, também referido como INK4A, CDK4I e MTS1, é um gene supressor de tumor, localizado no cromossomo humano 9p21 (LIANG et al., 2006). Codifica uma proteína de 156 aminoácidos, designada p16, que especificamente liga-se às quinases dependentes de ciclinas (CDKs), CDK4 e CDK6. Estas quinases são os principais parceiros catalíticos para as ciclinas. Colaboram com a ciclina E-CDK2 no controle da transição da fase G1 para S do ciclo celular (HELT et al., 2002). Mutações genéticas de p16 têm sido relacionadas com os carcinomas de colo uterino e também a outros cânceres humanos em face a infecção pelo HPV (LIANG et al., 2006).

No ciclo de divisão celular, a superexpressão da p16 selvagem inibe a progressão para fase G1 do ciclo celular, através da sua ligação ao complexo CDK4/ciclina D1. Desse modo, ocorre o bloqueio da atividade quinase da enzima. A perda funcional do p16 resulta na proliferação celular anormal pela remoção da chave

do ponto de checagem do ciclo celular, o que permite que as células progridam, irrestritamente, para a fase S. As mutações do CDKN2A geram variantes de p16 que têm suas habilidades de inibir a atividade catalítica do complexo CDK4/ciclina D1 prejudicadas, não permitindo a formação de um complexo estável com a quinase. O gene INK4a alterado participaria do estágio inicial da transformação neoplásica de ceratinócitos e da progressão de carcinomas em pele e membranas mucosas (LIANG,2006).

Diversos estudos têm avaliado o papel de p16INK4a como marcador diagnóstico de progressão de lesões cervicais servindo como parâmetro para o diagnóstico do HPV. Ressalta-se que existe uma variação nos critérios de avaliação e interpretação da marcação da proteína p16INK4a entre diferentes trabalhos, como por exemplo a localização da proteína (positividade nuclear e/ou citoplasmática), a porcentagem de células positivas (focal e difusa) e a distribuição da marcação dentro do epitélio (topografia) (KALOF et al., 2007).

Esses trabalhos apontam ausência de expressão de p16 na mucosa cervical normal (MCCLUGGAGE, 2006; ELEUTÉRIO JR et al., 2007). Entretanto, outros relatam a detecção de uma expressão pequena da proteína p16 mesmo em amostras de tecido cervical normal (ZUR HAUSEN, 2000; ZHANG et al., 2002).

Nas lesões de alto grau de colo uterino, os estudos descrevem o aumento da expressão dessa proteína em 60 a 100% das amostras analisadas. A maior variação da expressão da proteína p16INK4a é observada nas lesões cervicais de baixo grau, onde a maioria dos trabalhos observa uma positividade para essa proteína em 30 a 50% das amostras, possivelmente o mecanismo envolvido seria o acúmulo da proteína alterada ou afuncional (REDMAM, 2008).

Esses resultados sugerem que apenas uma parte das lesões de baixo grau infectadas pelo HPV, ou seja, aquelas infectadas por HPVs de alto risco, apresentaria a expressão desregulada das oncoproteínas virais, com consequente aumento da expressão de p16INK4a. Porém, as lesões negativas para p16INK4a poderiam estar infectadas por HPVs de baixo risco ou a expressão das oncoproteínas seria muito baixa ou até mesmo nula neste tipo de lesão. Muitos estudos foram dedicados a investigar a correlação da expressão de p16, no contexto da infecção pelo Papilomavírus Humano (ELEUTÉRIO JÚNIOR et al., 2007).

Dessa forma destaca-se que nos últimos 10 anos um grande número de

estudos tenha sido direcionado à análise semi-quantitativa de p16 em amostras cervicais, porém observa-se certa variação na expressão da proteína em diferentes grupos de lesão, e na mucosa normal (MCCLUGGAGE, 2006). De forma análoga ao que ocorre em lesões cervicais, vários autores tem destacado seu uso na progressão de lesões orais associadas ao HPV, servindo como marcador diagnóstico desta infecção (LI et al., 2007; EL-MOFTY et al., 2008).

Já a ciclina D1 é conhecida por seu uso em estudo sobre a agressividade tumoral de neoplasias malignas. É codificada pelo gene CCN1 localizado no cromossomo 11q3, que é considerado um oncogene. A ciclina D1 é expressa, com nível elevado, no meio e fim da fase G1 do ciclo celular. A superexpressão das ciclinas D1 pode resultar na perda da função da pRb. Isso ocorre pela fosforilação inapropriada e consequente inativação da pRb. As células neoplásicas que têm expressão aumentada da atividade ciclinaD/CDK4 geralmente, mantém a expressão da pRb selvagem e dessa forma a baixa regulação da ciclina D1 pode resultar em morte celular por apoptose (KOONTONGKAEW et al., 2000).

O aumento da proliferação celular foi demonstrado em cultura de células com superexpressão da ciclina D1. A sua superexpressão, com ou sem a amplificação do gene, tem sido relatada em diversos tumores malignos humanos (KOONTONGKAEW et al., 2000).

O papel da ciclina D1 no desenvolvimento, progressão e prognóstico do carcinoma de células escamosas oral é controverso porém, é mostrado superexpressão de ciclina D1. Esta tem sido associada com pior prognóstico nos CEO associados ao HPV, mas não foi encontrada a mesma correlação em tumores de outras localizações (XAVIER, 2005).

2.6 Imunoexpressão de Ki67

A proteína Ki67 é utilizada como marcador há cerca de 30 anos e se tornou nos dias de hoje, um dos principais marcadores histológicos de proliferação. Codificada por um gene de quase 30 Kb, a proteína Ki67 apresenta 395 Kda. Essa proteína sofre eventos de fosforilação e desfosforilação durante a mitose, é suscetível à ação de proteases e apresenta uma estrutura compatível com o fato de que sua expressão possa ser regulada por vias proteolíticas. Ki67 também compartilha similaridades estruturais com outras proteínas envolvidas no ciclo celular, que

apresentam o domínio FHA (forkhead-associated) (LIANG, 2006).

A expressão de Ki67 parece ser altamente controlada por sistemas precisos de síntese e degradação, possivelmente envolvendo a ação de proteossomas. Durante a interfase, Ki67 é exclusivamente detectada no interior do núcleo, associada ao nucléolo. Estudos descrevem a associação de Ki67 com o componente fibrilar denso (CFD) do nucléolo, que consiste em uma das três regiões sub-nucleolares, que contêm uma variedade de proteínas, necessárias à produção das unidades ribossomais. A próxima mudança aparente na distribuição da proteína ocorre durante a prófase, onde Ki67 dissocia-se do nucléolo e localiza-se na periferia cromossomal (KIM et al., 2007).

Durante a metáfase e a anáfase, a proteína é encontrada em regiões pericromossomais encobrindo a cromatina condensada. Na telófase, a proteína Ki67 é novamente localizada nos núcleos recém-formados, originando pequenas estruturas nucleares, que ainda estão presentes na fase G1 recente, quando as células iniciam a reorganização do núcleo e demais estruturas nucleolares. A relocação da proteína Ki67 da periferia cromossomal para o nucléolo, ainda é tema de discussão (LIANG et al., 2006).

Ao contrário da vasta informação disponível sobre a estrutura, padrão de localização e regulação de Ki67, pouco se sabe sobre a exata função desta protéina na proliferação celular, no entanto, os trabalhos revelam que as células que não expressam Ki67 têm incapacidade de divisão celular permanecendo em interfase indefinidamente (IAMAROON et al., 2004; LIANG et al., 2006).

Adicionalmente, com base na localização de Ki67 em sítios extranucleolares durante a fase G1, também sugere-se para essa proteína um papel na organização do DNA. A função estrutural para Ki67 também é proposta, com base na capacidade dessa molécula de interagir com outras proteínas celulares como as histonas do DNA (LEWIS, 2012).

Contudo, apesar da exata função de Ki67 nos eventos de proliferação celular ainda permanecer obscura, este marcador tem sido amplamente utilizado nos serviços de anatómapatologia como fator prognóstico tumoral (KRUSE et al., 2003).

3. OBJETIVOS

A) Objetivo Geral:

Avaliar a expressão imunoistoquímica de p16, ciclina D1 e Ki67 em lesões orais.

B) Objetivos Específicos:

- 1.** Categorizar as lesões benignas orais com detecção microscópica de coilocitose e o câncer de boca segundo as variáveis de sexo, idade e sítio anatômico.
- 2.** Comparar a presença microscópica de coilocitose das lesões benignas orais com a positividade do teste de imunoistoquímica para p16 e ciclina D1.
- 3.** Avaliar a positividade de p16, ciclina D1 e Ki67 em lesões malignas orais.
- 4.** Determinar a relação entre a positividade simultânea para p16, ciclina D1 e Ki67 em lesões benignas com detecção microscópica de coilocitose e o câncer de boca.

4. METODOLOGIA

4.1 Caracterização do estudo

Trata-se de um estudo observacional, transversal, quantitativo realizado por meio do levantamento de biópsias de blocos parafinados de lesões orais no período de 2008 a 2013.

4.2 Casuística

Foram selecionados blocos parafinados de lesões orais benignas com presença microscópica de coilocitose e câncer de boca cadastrados no Laboratório de Patologia Bucal do curso de Odontologia da Universidade Federal do Ceará *campus* Fortaleza. O grupo das lesões benignas foi constituído pelo papiloma escamoso oral (16 casos) e hiperplasia fibroepitelial com indicativos citológicos de infecção viral descritos no laudo histopatológico (24 casos); e para as lesões malignas, foi considerado o carcinoma de células escamosas, separados em subgrupos, entre os pacientes que estavam acima ou abaixo de 50 anos (14 casos cada um), para aqueles cuja idade estava acima de 50 anos foram selecionados apenas os fumantes e os abaixo de 50 anos os não fumantes (MENDEZ et al., 2012). Lesões de hiperplasia fibroepitelial sem aspectos citopatológicos de infecção por HPV (20 casos) foram utilizadas como grupo controle negativo (mimetizador da mucosa normal), para fins comparativos apenas de positividade sugestiva no exame histopatológico (alterações citológicas) e na IQ (Imunoistoquímica) para positividade de p16, ciclina D1 e Ki67.

4.3 Cálculo amostral

O cálculo amostral foi determinado para proporcionar um poder de teste de 80% com um intervalo de confiança de 95% para detectar uma diferença clinicamente relevante entre os grupos de pacientes portadores de lesões benignas e/ou malignas com presença microscópica de coilocitose e a mucosa normal em preparados histológicos e submetidos à análise imunoistoquímica. Para tanto, estabeleceu-se que uma diferença de 10% entre os grupos deveria ser detectada, ou seja, a presença de coilocitose aumentaria em pelo menos 10% quando comparado à mucosa normal (LINDQUIST et al., 2012).

Assim para que os requisitos fossem satisfeitos foi calculado o tamanho da amostra em 18 pacientes por grupo.

4.4 Critérios de inclusão e exclusão da amostra

Foram incluídas lesões benignas orais com indícios citológicos de infecção por HPV (coilocitose) e os casos de CEC separados entre os que estavam acima e abaixo de 50 anos, todos diagnosticadas no período de 2008 a 2013, para o grupo de CEC acima de 50 anos adicionalmente foram considerados apenas aqueles cujo o laudo continha a informação de que o paciente era tabagista crônico.

Foram excluídas as lesões localizadas em orofaringe e aquelas em que os registros de biópsia não continham informações sobre sexo, idade e localização completos. Além disso, todos os casos em que os blocos não foram localizados ou não estavam em bom estado de conservação foram retirados da amostra.

4.5 Análise clinicopatológica da amostra

Dados clínicos referentes à localização anatômica das lesões, o sexo e a idade foram retirados dos registros de biópsias dos pacientes. Para o estudo das lesões de natureza benigna, a faixa etária foi dividida em décadas entre 0 a 60 anos, de acordo com a divisão preconizada pela OMS (Organização Mundial da Saúde), deixando aqueles cuja idade era superior a 60 anos em um só grupo. A localização anatômica da cavidade oral foi feita sendo considerados mucosa jugal, língua, rebordo alveolar, lábio, palato e assoalho bucal (ALMEIDA et al., 2011).

4.5.1 Análise Histológica (Hematoxilina-Eosina)

As lâminas correspondentes a cada lesão foram revisadas por um patologista oral experiente. Para fins de diagnóstico indicativo de infecção viral, foram vistos os aspectos histomorfológicos na microscopia óptica em espécimes corados pela hematoxilina-eosina e descritos na literatura como fortes indicadores de infecção por HPV como: coilocitose (halo claro peri-nuclear, irregularidade nuclear e hiperchromasia nuclear, podendo ser observada ou não binucleação), diseratose, papilomatose, hiperceratose, acantose e grânulos de ceratohialino proeminentes. Dentre estas

características, a coilocitose se destaca como sinal fortemente sugestivo da existência de infecção por este vírus. Para cada alteração indicativa de infecção viral encontrada foi atribuído um escore, e as lesões que apresentaram um somatório igual ou superior a quatro foram consideradas positivas para a possível associação com o HPV (ELMOFTY et al., 2008).

4.6 Expressão Imunoistoquímica

Após a revisão histopatológica e coleta dos blocos correspondentes, todas as lesões foram submetidas a reação por imunoistoquímica utilizando o p16 e a ciclina D1. O primeiro como parâmetro comparativo com a coilocitose, e o segundo para avaliação complementar. Adicionalmente o Ki67 foi utilizado apenas nos grupos de CEC abaixo de 50 anos, hiperplasia fibroepitelial com indícios citológicos de infecção por HPV (os quais foram simultaneamente positivos para p16 e ciclina D1), e a hiperplasia fibroepitelial (controle negativo) com o intuito de avaliar a taxa de proliferação celular nos casos que tiveram a coilocitose presente no exame histopatológico.

4.6.1 Preparo do material/ Protocolo da reação

As reações de imunoistoquímica foram realizadas em cortes histológicos de $3\mu\text{m}$ de espessura, dispostos em lâminas microscópicas silanizadas, a partir de blocos parafinados, utilizando o sistema automatizado BENCHMARK XT IHC/ISH VENTANA (ROCHE).

A recuperação antigênica dos espécimes foi realizada com solução EZ prep.(ROCHE®) seguindo os tempos de 60 minutos para ciclina D1, e de 30 minutos para p16 e Ki67. Os anticorpos primários utilizados tiveram as seguintes diluições: p16 (Dako®) (1:100), Ciclina D1 (Dako®) (1:300) e Ki-67(Dako®) (1:50). O complexo SABC (estreptoavidina/biotina/imunoperoxidase) indireta foi revelado através da técnica de detecção pelo sistema XT Ultraview DAB (cromogêmo diaminobenzidina). Após a revelação, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris. Foram utilizados controles positivos externos da reação, porém, individuais em cada lâmina. Para o anticorpo p16 foi usada a lesão cervical de alto grau, para a ciclina D1 o intestino delgado e para o Ki67 linfonodos. O controle negativo interno foi realizado através da

supressão do anticorpo primário em cada reação. No quadro abaixo, estão descritos os anticorpos primários empregados, clones, tempo de incubação do anticorpo e diluição individuais.

Quadro 1: Especificidade, clone, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários empregados na amostra.

ESPECIFICIDADE	CLONE	DILUIÇÃO	RECUPERAÇÃO ANTIGÊNICA	TEMPO DE INCUBAÇÃO DO ANTICORPO
*p16	SP4	1:100	Solução EZ prep.(ROCHE®), por 60 minutos	16 minutos
*Ciclina D1	DCS-6	1:300	Solução EZ prep.(ROCHE®), por 30 minutos	32 minutos
*Ki67	MIB-1	1:50	Solução EZ prep.(ROCHE®), por 30 minutos	30 minutos

* Dako®, Denmark A/S.

4.6.2 Captura de Imagens Digitais

Imagens digitais dos preparados histológicos foram capturadas de forma padronizada, por um patologista experiente, utilizando-se, para tanto, um microscópio de luz (Olympus CX 31, Olympus Corporation, Japão) equipado com uma câmera digital (Sony 10.1 megapixels, Sony Corporation, Japão). O procedimento foi compreendido, inicialmente, numa varredura de cada amostra, utilizando o aumento de 100x vezes, com a finalidade de identificar as zonas de maior densidade. Posteriormente, foram selecionados os 10 (dez) melhores campos de visualização, no aumento de 400x. Em seguida foram fotografadas as imagens digitais coloridas dos campos escolhidos e armazenadas no formato Windows® Bitmap (BMP).

4.6.3 Densidade de marcação epitelial

Com o auxílio do software adaptado para microscopia (MBF Image J), foram contadas as células coradas em marrom, do epitélio de superfície, determinando a densidade de ceratinócitos em cada campo. A imunoexpressão foi considerada tanto de forma difusa como focal, em núcleo e/ou citoplasma, sendo descritos não somente o número de células coradas como também a intensidade de coloração (KALOF et al., 2007). Foi excluída, no entanto, para efeito de contagem, a camada basal do epitélio, nas lesões benignas, pois nesta camada os ceratinócitos possuem alta taxa de mitose, podendo expressar as proteínas utilizadas (p16, ciclina D1 e Ki67). A marcação foi categorizada de forma dicotômica, separados entre positivos e negativos, sendo considerados positivos aqueles cuja a razão entre as células coradas sobre o total do campo foi igual ou superior a 10%, calculados pela média de dez campos por amostra. Adicionalmente também foram avaliados o perfil quantitativo de imunomarcação celular para as proteínas supracitadas (KALOF et al., 2007). Especificamente nas lesões malignas foram contados separadamente os 10 (dez) campos peritumorais e intratumorais para o p16 e ciclina D1.

4.7 Análise estatística

Os dados brutos foram tabulados no Microsoft Excel (versão 2013) e exportados para o software de análise estatística *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versão 17.0, para Windows, no qual todas as análises foram realizadas considerando um intervalo de confiança de 95%.

Utilizou-se o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliação do padrão de distribuição das variáveis quantitativas (percentual de células imunopositivas) e os testes de Kruskall-Wallis seguido do pós-teste de Dunn (dados não-paramétricos) e o teste de Mann-Whitney para comparação entre grupos. Foi utilizada a correlação de Spearman para avaliação da relação entre o percentual de células imunopositivas nos grupos abordados. Adicionalmente utilizou-se os testes de Fisher ou Qui-quadrado para avaliação das variáveis de contingência (sexo, localização, idade e dicotomização de imunomarcação celular).

4.8 Aspectos Éticos

O projeto foi encaminhado e aprovado pelo o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, que regulamenta pesquisa em seres humanos, sob número de protocolo 255.612/14 (Apêndice 2).

5. RESULTADOS

Na revisão da análise histológica de todos os espécimes estudados, observou-se a presença de coilocitos associados no mínimo à três alterações sugestivas de infecção por HPV. Nos casos de PO, a coilocitose estava associada a paraceratose, seguida da disceratose e, por vezes, da granulose. No grupo das hiperplasias fibroepiteliais/coilocitose (HFE/Col), as alterações citopatológicas eram encontradas principalmente nas camadas espinhosa e superficial com exuberante coilocitose associada à paraceratose e granulose.

A análise das zonas perilesionais de tecido epitelial não neoplásico revelou presença de coilocitos apenas nos casos de CEC abaixo 50 anos, com exceção de um espécime do grupo CEC acima de 50 anos, onde este foi detectada disceratose seguida de paraceratose e granulose. Ressalta-se que apenas nos casos de CEC abaixo de 50 anos, foram achados até 04(quatro) alterações citológicas indicativas de possível infecção viral (HPV). Em uma amostra de CEC abaixo de 50 anos, adicionalmente, havia a informação anexa ao laudo histopatológico de que o paciente havia recebido há três anos o diagnóstico de condiloma acuminado, posteriormente na mesma localização anatômica do condiloma surgiu o CEC sem aparente associação a outros fatores de risco.

Em todos os casos de CEC acima de 50 anos, em que os pacientes eram tabagistas crônicos, foi encontrada degeneração vacuolar expressiva nas zonas perilesionais, contudo sem se identificar alterações na cromatina nuclear.

O PO apresentou uma frequência de positividade para a coilocitose um total de 85,71% ; o HPE/Col, 100%; o CEC em pacientes abaixo de 50 anos, 92.31% e o CEC acima de 50 anos, 6,7%. No grupo controle negativo, os critérios microscópicos de infecção viral não foram visualizados (Tabela 1). Ressalta-se, porém, que alguns casos de HFE apresentaram hiperceratose e/ou granulose sem estar associado a presença de coilocitos sendo considerados, portanto, negativos em todos os casos revisados. Na análise desta variável encontrou-se diferença estatisticamente significante em todos os grupos, em relação ao controle negativo ($p<0.001$) (Tabela 1).

Tabela 1: Dados em frequência absoluta e relativa da revisão histológica da presença de coilocitose de 89 lesões orais ($p<0.001$).

Grupo	Positivo	Negativo	
HFE/Col	25*	0	<0.001
	100%	0%	
PO	20	1	
	85.71%	14.28%	
CEC-50	12*	2	
	92.31%	7.69%	
CEC+50	1*	13	
	6.7%	93.3%	
HFE(controle)	0	20	
	0.0%	100.0%	

* $p<0.05$, Qui-quadrado (n, %)

Quanto ao sexo houve prevalência maior no feminino em relação ao masculino, em toda a amostra teste. O grupo HFE/Col teve uma taxa de 66,7%, o PO de 50%, o CEC em pacientes abaixo de 50 anos de 64,3%. No entanto, a análise estatística não revelou significância desta variável nos grupos analisados ($p=0,830$). Os casos de CEC em pacientes acima de 50 anos, nos quais não foram encontradas forte presença de coilócitos, observou-se um percentual de 50% (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição por sexo de 69 lesões orais ($p=0.830$).

Grupo	Masculino	Feminino	p-Valor
HFE/Col	8 33,3%	16 66,7%	0.830
PO	8 50,0%	8 50,0%	
CEC+50	7 50,0%	7 50,0%	
CEC-50	5 35,7%	9 64,3%	

Qui-quadrado (n, %)

Na distribuição por faixa etária, foi observada uma maior prevalência de PO e HFE/Col entre adultos principalmente entre a quarta e quinta décadas de vida com uma média de 45 anos (Tabela 3), não sendo encontrada, no entanto, diferença estatisticamente significante quanto a idade ($p=0,701$).

Tabela 3: Distribuição etária de 40 lesões orais com presença de coilocítos ($p=0,649$).

Grupos	Faixa etária	n	p-Valor
HFE/Col	0-10	0(0,0%)	0.701
	11-20	1(4,17%)	
	21-30	1(4,17%)	
	31-40	1(4,17%)	24
	41-50	9(37,50%)	
	51-60	5(20,83%)	
	+ de 60	8(33,33%)	
PO	0-10	0(0,0%)	
	11-20	1(6,25%)	
	21-30	1(6,25%)	16
	31-40	1(6,25%)	
	41-50	6(37,50%)	
	51-60	5(31,25%)	
	+ de 60	2(12,50%)	

* $p<0,05$, Qui-quadrado (n,%). IC 95% = Intervalo de confiança de 95%. Média de Idade: 47.5 +/- 18.

Quanto ao sítio anatômico, o grupo HFE/Col apresentou maior prevalência no rebordo alveolar seguida da mucosa jugal tendo, respectivamente, 35.7% e 33.3% do total deste grupo. Já no PO, o assoalho bucal e o rebordo alveolar foram os sítios anatômicos mais prevalentes com 43.75% e 25%, respectivamente. A língua e o palato representaram as principais localizações do CEC abaixo de 50 anos (21.42% e 20,00%, ambos), e no grupo acima de 50 anos, a língua com 35.71%, o rebordo alveolar e o palato ambos com 14.28% (Tabela 4). A análise estatística desta variável mostrou significância estatística na localização mucosa jugal (HFE/Col) e língua (CEC+50) ($p=0,015$) (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição por localização anatômica de 69 lesões orais ($p=0.015$).

Grupo	Localização						p-Valor
	Assoalho Bucal	Lábio	Língua	Mucosa Jugal	Palato	Rebordo Alveolar	
HFE/Col	12.5%	4.16%	4.16%	33.33%	8.33%	37.5%	0.015
	3	1	1	8*	2	9	
PO	43.75%	6.25%	6.25%	0.0%	6.25%	25.00%	
	7*	1	1	0	1	6	
CEC-50	21.42%	14.28%	21.42%	7.14%	21.42%	14.28%	
	3	2	3	1	3	2	
CEC+50	7.14%	7.14%	35.71%	21.42%	14.28%	14.28%	
	1	1	5*	3	2	2	

* $p<0.05$, Qui-quadrado (n, %)

A imunomarcação para p16 foi visualizada, principalmente no núcleo, embora não limitada ao mesmo, podendo ser difusa e focal. Nas amostras do grupo CEC-50 positivos para p16, a imunomarcação foi alta, intensa e difusa, podendo ser identificada em núcleo e/ou citoplasma. Um caso de CEC+50 apresentou este mesmo padrão de imunomarcação de forma difusa e intensa, além de ser observada coilocitose na camada superficial do tecido perilesional, quando da análise da coloração de hematoxilina-eosina. Nas lesões benignas (HFE/Col e PO), no entanto, a expressão de p16 foi focal e nem sempre exibia coloração simultânea nuclear e/ou citoplasmática (Figura 2).

O perfil de imunomarcação dicotômico (positivos e negativos), para p16, mostrou alta expressão nos grupos de HFE/Col, PO e CEC-50 ocorrendo o oposto nos demais casos sendo encontrada diferença estatisticamente significante para esta variável ($p<0.001$) (Tabela 5).

Em relação a avaliação quantitativa do percentual de células imunomarcadas para p16, observou-se uma razão média elevada no grupo CEC-50 seguido do HFE/Col e PO. No grupo controle, no entanto, a razão foi baixa. Na análise do perfil quantitativo de expressão de p16, houve diferença significante nos grupos CEC-50 em relação ao controle negativo HFE ($p<0.001$) (Tabela 7).

Tabela 5: Imunomarcação de p16 de 89 lesões orais com presença microscópica de coilocitose ($p<0.001$).

Grupo	p16		p-Valor
	-	+	
HFE/Col	8	16*	<0.001
	20.0%	80.0%	
PO	4	11*	
	25%	75.0%	
CEC-50	1	13*	
	7.1%	92.9%	
CEC+50	13	1	
	92.9%	7.1%	
HFE(controle)	16	4	
	80%	20%	

* $p<0.05$, Qui-quadrado

A expressão de ciclina D1 foi positiva nos grupos HFE/Col, PO e CEC-50, apresentando significância estatística ($p<0.001$) em relação ao controle negativo (HFE), (Tabela 6).

O padrão de marcação foi difuso e homogêneo em todos grupos de lesões benignas e no CEC-50, porém nos casos de carcinomas, a intensidade de coloração era frequentemente aumentada contrastando com os grupos de lesões benignas. Além disso, observou-se que a imunomarcação era, predominantemente, suprabasal e raramente ultrapassava a camada espinhosa. (Figura 2).

Tabela 6:Imunomarcação para ciclina D1 de 89 lesões orais ($p<0.001$).

Grupo	Ciclina D1		p-Valor
	-	+	
HFE/Col	8	16*	<0.001
	33.3%	66.7%	
PO	6	10*	
	37.5%	62.5%	
CEC- 50	2	12*	
	14.28%	85.72%	
CEC+50	11	3	
	78.57%	21.43%	
HFE	16	4	
	80%	20%	

* $p<0.05$, Qui-quadrado (n, %).

Quanto à análise quantitativa de células imunomarcadas para ciclina D1, houve alta expressão nos grupos CEC-50, HFE/Col e PO, porém sem significância estatística ($p=0.501$) (Tabela 7).

Tabela 7: Avaliação quantitativa de células imunomarcadas para p16 e ciclina D1 de 89 lesões orais com evidência microscópica de coilocitose ($p<0.001$).

	Grupo	Média±DP	Mediana (Mínimo - Máximo)	p-Valor
p16	HFE*	10.1±21.2	14.0 (0.0 – 23.0)	<0.001
	HFE/Col	20.6±12.2	24.0 (3.0 - 37.0)	
	PO	24.9±6.4	23.0 (12.0 - 37.0)	
	CEC-50†	65.7±13.0	61.0 (32.0 - 78.0)	
	CEC+50	5.9±13.0	1.0 (0.0 - 51.0)	
Ciclina D1	HFE	11.0±17.0	12.0 (0.0 – 18.0)	0.501
	HFE/Col	13.6±9.5	16.0 (0.0 - 28.0)	
	PO	18.0±5.5	18.0 (10.0 - 30.0)	
	CEC-50	35.5±20.0	37.0 (3.0 - 32.0)	
	CEC+50	3.4±8.7	1.0 (0.0 - 34.0)	

* $p<0.05$ em relação aos demais grupos; † $p<0.05$ em relação aos demais grupos (Kruskal-Wallis/Dunn, dados expressos em forma de percentual de células marcadas).

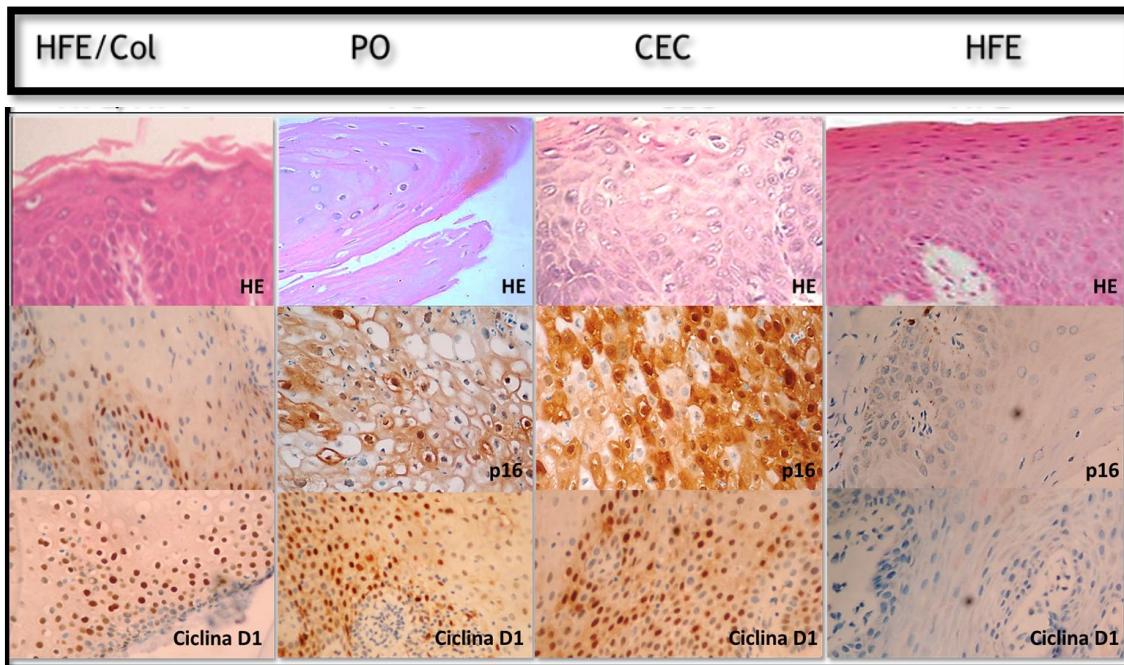


Figura 2: Fotomicrografia de HFE/Col, PO, CEC e HFE corados em HE e, respectiva expressão imunoistoquímica de p16 e ciclina D1. Aumento de 400x. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal – Universidade Federal do Ceará.

Ao realizar-se a correlação entre a quantidade de células imunomarcadas para p16 e ciclina D1 em comparação aos escores citopatológicos sugestivos de infecção viral, verificou-se que apenas o grupo HFE/Col apresentou correlação positiva com p16 ($p<0.05$; Tabela 8). A comparação entre os campos peritumorais com os intratumorais positivos para p16 e ciclina D1 em relação aos parâmetros histológicos de possível infecção viral revelou moderada correlação entre p16 em região peritumoral e ciclina D1 diretamente no tumor (CEC-50), porém sem significância estatística (Tabela 9).

Tabela 8: Correlação de escores citopatológicos sugestivos de infecção viral e o perfil de celular (quantitativo) de imunomarcação celular para p16, ciclina D1 de 40 lesões benignas orais associadas a coilocitose.

Grupo		P16	Ciclina D1
HFE/Col	r	0,500*	0,404
	p-Valor	0,049	0,013
PO	r	0,043	0,281
	p-Valor	0,873	0,292

*p<0.05, Correlação de Spearman

Tabela 9: Avaliação quantitativa de imunomarcação celular entre as zonas peritumorais e intratumorais de 28 lesões de CEC em relação aos escores citopatológicos sugestivos de infecção viral.

		P16 Peritumor	P16 Intratumor	Ciclina D1 Peritumor	Ciclina D1 Intratumor
CEC-50	r	0,512	0,037	0,262	0,609
	p-Valor	0,061	0,900	0,366	0,021
CEC+50	r	0,029	0,110	0,042	0,096
	p-Valor	0,918	0,695	0,081	0,032

*p<0.05, Correlação de Sperman

A imunoexpressão de Ki67 nos espécimes benignos (HFE/Col) estendeu-se até a porção média da camada espinhosa. Em poucas amostras do grupo controle negativo (HFE) houve positividade para o Ki67. Já no CEC-50 a imunomarcação foi observada, frequentemente, em toda a camada espinhosa (Figura 3). Ao comparar o perfil de imunomarcação em relação aos casos positivos e negativos (dicotômicos) não se encontrou diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p=0.789$) (Tabela 9).

Na avaliação quantitativa de células imunomarcadas, o Ki67 não só foi numericamente expressivo no grupo do CEC-50 como foi estatisticamente significante em relação ao controle negativo (HFE) ($p<0.001$) (Tabela 10).

Tabela 10: Perfil de imunomarcação para Ki67 de 38 lesões orais.

Grupo	Ki67		p-Valor
	-	+	
HFE/Col	5 35,7%	9 64,3%	1,000
HFE	7 70%	3 30%	
CEC-50	4 28,57%	10 71,43%	

*p<0,05, Qui-quadrado

Tabela 11: Avaliação quantitativa do perfil de células imunomarcadas para Ki67 de 38 lesões orais.

Grupo	Ki67		p< Valor
	Média±DP	Mediana (Mínima - Máxima)	
HFE/Col	27.2±12.6	24 (08 - 56)	0,005
HFE	23.8±9.1	25 (05 - 12)	
CEC-50	60.6±25.0*	65.5 (17 - 95)*	

*p<0,05 em relação ao controle negativo (Kruskal-Wallis/Dunn, dados expressos em forma de percentual de células marcadas).

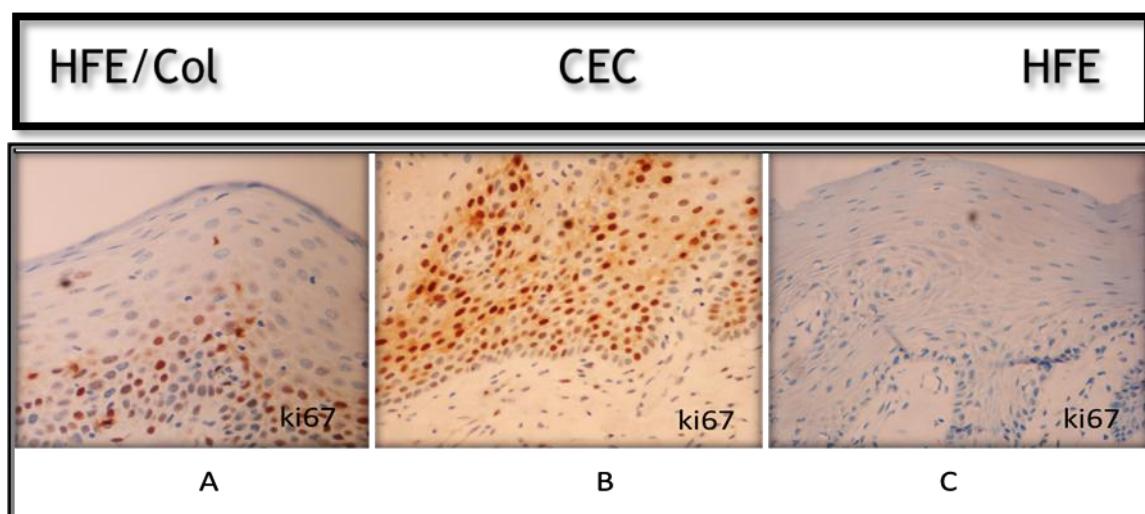


Figura 3: Fotomicrografia dos grupos HFE/Col (A), CEC-50 (B) e HFE (C), imunomarcados por Ki67. Aumento de 400x. Fonte: Laboratório de Patologia Bucal-Universidade Federal do Ceará.

6. DISCUSSÃO

A análise histopatológica não é capaz de identificar se há presença do HPV nem o tipo, o que só é possível através de técnicas como as de biologia molecular (CASTRO et al., 2009). No entanto, o estudo histomorfológico permite uma caracterização anatomapatológica de lesões com possível associação com o HPV, através de achados microscópicos como a paraceratose, a granulose, a papilomatose, a disceratose e principalmente a coilocitose. Esta última alteração, como principal indicativo de infecções por este vírus (DOOBAR et al., 2007; AL-SWIAHB et al., 2010; ANG et al., 2010; CHENEVERT e CHIOSEA, 2012). Estes autores corroboram os resultados do presente trabalho, no qual foi encontrada 85% de positividade de coilocitose, estando esta associada a pelo menos três ou mais alterações dentre as citadas acima, nas lesões orais benignas e malignas sugestivas de possível relação com infecção pelo HPV.

Hafkamp et al (2008) relataram que as lesões orais benignas e potencialmente malignas associadas a efeitos citopáticos do HPV são mais comuns em mulheres, embora o potencial de infecção e transmissão seja independente dos sexos. Analisando, no entanto, os achados da literatura especificamente sobre o PO e HFE/Col, foi visto que nestes casos a distribuição por sexo é uniforme (LACO et al., 2011). Xavier et al (2005) concluíram que homens são mais atingidos por PO e HFE/Col, enquanto que Lewis et al (2011) apontaram as mulheres como as principais afetadas. A amostra avaliada não apresentou diferença estatisticamente significante da prevalência do sexo tanto no grupo da HFE/Col como no PO, sendo concordantes com Laco et al (2011) e discordantes dos demais autores mencionados.

As lesões associadas a provável infecção por HPV em boca como a HFE/Col e o PO mostraram predileção por adultos jovens, embora haja ampla distribuição etária (BRANGAGNOLO, ELI e HAAS, 2010). A média de idade varia entre a quarta e quinta décadas de vida (DOOBAR et al., 2007; NISHIMURA et al., 2010). Na amostra avaliada, para os dois grupos (HFE/Col e PO), a média encontrada foi também de 40 anos, com uma prevalência variando entre a quarta e quinta décadas de vida, sendo, concordantes com Doobar et al (2007) e Nishimura et al (2010).

Quanto à distribuição anatômica, as lesões provavelmente associadas ao

HPV em cavidade oral ocupam áreas a depender do tipo específico de lesão. A HFE/Col incluem as mucosas labial, jugal e língua como as localizações mais frequentes (KIM et al., 2011). No presente estudo houve uma predileção pelo rebordo alveolar, seguido da mucosa jugal, na HFE/Col, sendo concordantes com a literatura, com relação a segunda localização anatômica. Já no caso do papiloma escamoso oral, os locais de predileção são a língua e o palato, embora outras regiões da cavidade oral possam ser afetadas (KIM et al., 2011). Estes dados são discordantes do que foi encontrado na presente pesquisa, onde o assoalho de boca e o rebordo alveolar foram os sítios anatômicos mais acometidos pelos papilomas orais.

Os principais sítios de localização do carcinoma espinocelular são a língua, o assoalho da boca, a gengiva, o rebordo alveolar e a mucosa jugal (ALMEIDA, 2011). Entretanto, estudos publicados, nos quais, foram registrados a ocorrência de coilocitose no CEC, a localização não segue a mesma frequência, sendo citados o lábio, a mucosa jugal, a gengiva, a língua e palato (UKPO et al., 2011; MILLS et al., 2012; PARK et al., 2012). É sugerido provável associação com hábitos sexuais de risco, pois estes sítios anatômicos parecem ser mais expostos ao micro trauma do sexo oral, servindo de meio de entrada do vírus (TRISTÃO et al., 2012). Contudo, a literatura é controversa quanto a associação entre sítio anatômico das lesões em cavidade oral e o HPV. Xavier (2005) demonstrou em seu estudo que praticamente toda a mucosa oral está exposta a micro-traumas causados pelo sexo oral, quando comparou a língua com mucosa jugal e lábio em relação a tecidos saudáveis não encontrou diferença significante quanto a presença de coilocitose e a imunoexpressão de p16 em relação ao controle negativo (mucosa normal).

Os trabalhos mais recentes sobre o câncer de boca mostram o HPV como possível participante da patogênese do CEC oral. Mediante a presença de alterações citológicas consistentes com infecções virais, em áreas adjacentes ao tumor, os pesquisadores tentam confirmar a presença deste vírus submetendo suas amostras a testes como o PCR, captura híbrida e imunoistoquímica com o intuito de identificar e quantificar os subtipos de alto risco como também direcionar o diagnóstico (EVANS et al; 2011; FIEDLAND et al; 2012; GAO et al., 2013). Na amostra avaliada foi encontrada frequentemente coilocitose no epitélio adjacente ao grupo CEC abaixo de 50 anos, além de positividade intensa e difusa do marcador p16, o qual está superexpresso nas células infectadas pelo HPV (GAO et al., 2013).

Segundo Wentzensen (2008) o p16 está diretamente relacionado ao aumento da expressão das proteínas virais E6 e E7. As principais ações destes oncogenes do HPV são a degradação de p53 pelo E6 e, assim, a prevenção de apoptose, além da liberação de E2F de pRb. Fisiologicamente, a ativação E2F é mediada por fosforilação da proteína Rb. Esta via é estritamente regulada por um conjunto de quinases dependentes da ciclina, as quais controlam a fosforilação de pRb (cinases dependentes de ciclina). Em células epiteliais com infecção por HPV, a regulação da Rb-E2F é alterada por E7 e a ativação de p16 não tem o efeito regulador desejado. Como resultado, p16 é fortemente superexpressa e se acumula nas células, porém, sem função. Essas propriedades de p16 fazem desta proteína um excelente biomarcador para os cânceres relacionados ao HPV.

Eleutério Jr et al (2007) estudando a proteína p16 em lesões cervicais, observaram a ausência desta em amostras de tecido normal de colo uterino, contrastando com os casos de lesão cervical de alto grau onde essa molécula foi expressa. Segundo estes autores a presença de p16 está diretamente relacionada às infecções cervicais associadas ao HPV.

Tavajara et al (2011) e Popovíc et al (2010) também demonstraram forte correlação entre a positividade por PCR em lesões de cabeça e pescoço associadas ao HPV e a expressão imunoistoquímica simultânea de p16.

Em trabalho desenvolvido com amostras de CECs orais que apresentavam indícios citológicos sugestivos de infecção viral (comparados à mucosa normal ou a lesões reativas) observou-se que 60% dos casos apresentava p16 expresso enquanto que no controle negativo a imunomarcação era menor que 15% (EL-MOFTY et al., 2008). Estes dados contribuem para validar os achados do presente estudo no qual as alterações citopatológicas (principalmente, a coilocitose) aliadas à expressão imunoistoquímica de p16 estiveram presentes em lesões orais (benignas e malignas) com provável associação viral, enquanto que no grupo controle negativo nenhum destes parâmetros foram observados.

Hoffman et al (2012) analisando CECs orais em pacientes fumantes e não fumantes verificou que os espécimes com alterações histopatológicas de infecção viral (coilocitose) e alta taxa de positividade para a molécula p16, especialmente, no grupo que não fumava, mostraram confirmação da presença do vírus através de testes de biologia molecular (captura híbrida). Comparados à amostra do presente trabalho, os dados são concordantes, visto que, nos pacientes acima de 50 anos, que eram fumantes,

não foram observados, em sua maioria, efeitos citológicos sugestivos de infecção viral associados a baixa imunoexpressão de p16, contrastando com os casos abaixo de 50 anos (todos não fumantes) onde a imunoexpressão de p16 foi elevada.

Acrescenta-se, ainda, que Gao et al (2013), estudando HPV em lesões de cabeça e pescoço, constatou que em displasias epiteliais associadas a coilocitose ocorreu positividade elevada para o HPV tipo 16 tendo sua amostra imunoexpressão simultânea da proteína p16.

O fumo é o principal fator correlacionado ao câncer de boca, no entanto a presença de alterações citopatológicas de infecção viral em amostras sem a associação ao fumo suscita a hipótese da participação do HPV na sua etiopatogênese. Com base nas alterações na cromatina nuclear (coilocitose) os pesquisadores associam a expressão de p16 ao PCR ou ISH, para verificar se há presença do HPV e havendo, se corresponde a lesões ativas (ANG et al., 2010; AL-SWIAHB et al., 2012; CHENEVERT e CHIOSEA. 2012).

Portari (2008) estudou a expressão simultânea de p53, ciclina D1 e p16 em 281 lesões cervicais de alto grau e correlacionou a expressão imunoistoquímica das três proteínas encontrando forte associação entre as mesmas. Estes dados são concordantes com o presente estudo, onde a positividade de p16, como já descrito e discutido, e de ciclina D1 tiveram forte correlação em mucosa oral nos grupos HFE/Col e CEC-50.

Adicionalmente, Sousa (2007) analisando amostras de CECs orais com indícios citológicos de infecções virais observaram grande marcação para ciclina D1 e cruzando os dados de estadiamento tumoral com a expressão simultânea com pRb e p53 emcontrou correlação estatística significante.

No entanto, Angelo (2007) verificou em CECs orais uma baixa positividade para a imunomarcação de ciclina D1 (inferior a 10%), quando os efeitos citológicos sugestivos de infecção viral também estavam ausentes, dados que corroboram os resultados desta pesquisa, na qual a detecção de ciclina D1 no grupo CEC+50 (sem presença microscópica de coilocitose) foi baixa. Ressalta-se que na metodologia do referido autor, o mesmo avaliou somente as zonas perilesionais para efeito de contagem celular (imunoexpressão) e não houve subdivisão da amostra por idade.

Rocha et al (2007), estudou a atividade proliferativa de 21 carcinomas epidermóides orais utilizando o Ki67. Foram considerados dois grupos: HPV-positivo, para aqueles com expressão positiva de p16 e HPV-negativo, com expressão negativa de p16. Ao final do estudo, no entanto, não encontraram diferença estatisticamente significante. Mota et al (2009) também realizaram expressão imunoistoquímica em CECs provavelmente associados ao HPV em 29 amostras, comparando a atividade proliferativa através de Ki67 e p53. Quando comparados o perfil de imunoexpressão de Ki67 com o estadiamento tumoral e a marcação para p53 não foi encontrada diferença estatística. No presente estudo a imunoexpressão de Ki67 (quando descritos de forma dicotômica) também não apresentou significância ($p>0.005$).

Bahanassy et al (2007), Nam et al (2009) e Walts et al (2009) avaliaram a expressão quantitativa (percentual) de marcação celular para Ki67 em CECs orais associados aos efeitos citopatológicos sugestivos de infecção viral. Em seus estudos encontraram diferença significante na taxa de marcação celular (de Ki67 por IQ) em relação ao controle negativo, embora nas amostras os autores supracitados também realizaram PCR em tempo real. Estes resultados corroboram com os do presente trabalho, em relação a expressão imunoistoquímica, onde o percentual de marcação celular do Ki67 foi maior no grupo CEC-50.

Larsen et al (2014) enfatizam o quanto é difícil comparar os resultados obtidos de numerosas pesquisas sobre a presença e ação do HPV na mucosa oral por causa das muitas variações nos parâmetros de cada tipo de estudo como a amostra (tecido extraído por biópsia ou raspagem), seleção de método de preparação (fresco, congelado ou fixado), diferenças étnicas e geográficas entre os pacientes, e o uso diversificado de métodos e protocolos (automatizado ou manual).

Finalmente, o presente trabalho demonstrou que lesões orais representadas por HFE/Col, CEC-50 e PO, nas quais foram identificadas coloicitose, expressaram a proteína p16. Além disso, foi visualizada marcação simultânea para ciclina D1 e Ki67, principalmente nos grupos HFE/Col e CEC-50. Este dado pode vir a constituir, no futuro, como elemento complementar na avaliação do comportamento biológico destas lesões.

Sugere-se considerar a possibilidade da relação entre o carcinoma de células escamosas oral em pacientes jovens e a participação do HPV especialmente nos casos em que os demais fatores de risco (fumo e álcool) não estão presentes. A provável associação é elicitada, visto que as amostras avaliadas de CEC-50 apresentaram coilocitose peritumoral e intensa expressão de p16. No entanto, novas pesquisas utilizando os dados histopatológicos e a imunoistoquímica aliadas às técnicas sensíveis de biologia molecular para detecção viral são necessárias.

5. CONCLUSÕES

- A imunoexpressão de p16 e ciclina D1 foi observada em Papilomas Orais, Hiperplasias fibroepiteliais com coilocitose e no Carcinoma de células escamosas em pacientes abaixo de 50 anos, enfatizando-se a alta marcação de células neste último.
- Os grupos Hiperplasia fibroepitelial com coilocitose e Carcinoma de células escamosas em pacientes abaixo de 50 anos mostrou correlação significante entre a positividade simultânea para p16 e cilcina D1.
- A avaliação quantitativa de imunoexpressão de Ki67 foi significante no carcinoma de células escamosas em pacientes abaixo de 50 anos, em relação ao controle negativo.

6. REFERÊNCIAS

1. Almeida F. C. S.; Cazal C.; Nunes F. D.; Araújo M. E.; Dias B. D.; Silva D. P. Prognostic Factors in Oral Cancer. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde** Volume 15 Número 4 Páginas 471-478, 2011.
2. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, et al: Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: **Summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting**, November 9–10, 2008. 31st edition. Washington, D.C: Head & Neck; 2009:1393–422.
3. Angelo L A. P16INK4a expression correlates with degree of oral neoplasia: a comparison with Ki-67and Cyclin D1, expression and detection of high-risk HPV types. **Mod Pathol** 2007; 16: 665–73
4. Al-Swiahb JN, Huang CC, Fang FM, Chuang HC, Huang HY, Luo SD, Chen CH, Chen CM, Chien CY (2010) Prognostic impact of p16, p53, epidermal growth factor receptor, and human papillomavirus in oropharyngeal cancer in a betel nut-chewing area. **Arch Otolaryngol** 1136(5): 502–508.
5. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML (2010) Human papilomavírus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **N Engl J Med** 363(1):24–35.
6. Bahnassy A A et al. The possible role of cell cycle regulators in multistep process of HPV-associated oral carcinoma. **Clinical Pathology** 2007, vol 74 (2): 78-87.
7. Begum S, Westra WH (2008) Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status. **Am J Surg Pathol** 32(7): 1044–1050.
8. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, Schiffman MH, Moreno V, Kurman R, Shah KV (1995) Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. **J Natl Cancer Inst** 87(11): 796–802.

9. Bosch FX, Ritter D, Enders C, Flechtenmacher C, Abel U, Dietz A, Hergenhahn M, Weidauer H (2004) Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value. **Int J Cancer** 111(4): 530–538.
10. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, Meijer CJ, Ruijter-Schippers HJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2004) Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. **J Natl Cancer Inst** 96(13): 998–1006.
11. Bragagnolo A L., Eli D., Haas P. Human Papillomavirus (HPV). **Rev Brasileira de Análises Clínicas (RBAC)**, vol. 42(2): 91-96, 2010.
12. Castro, T.; Peixoto M; Patury Galvão et al . Detecção de HPV na mucosa oral e genital pela técnica PCR em mulheres com diagnóstico histopatológico positivo para HPV genital. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo , v. 75, n. 2, Apr. 2009.
13. Charfi L, Jouffroy T, de Cremoux P, Le Peltier N, Thioux M, Freneaux P, Point D, Girod A, Rodriguez J, Sastre-Garau X (2008) Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome. **Cancer Lett** 260(1–2): 72–78.
14. Chenevert J, Chiosea S (2012) Incidence of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas: now and 50 years ago. **Hum Pathol** 43(1): 17–22.
15. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS (2010) Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). **Head Neck Oncol** 2: 15–3284-2-15.
16. De Vita V, Lawrence T, Rosenberg S, DePinho R, Weinberg R (2008) DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Principles & Practice of Oncology. 8th edn. Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, USA.
17. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, Stanley MA (2012) The biology and life-cycle of human papillomaviruses. **Vaccine** 30(Suppl 5): F55–F70.

18. El-Mofty SK, Patil S (2006) Human papillomavirus (HPV)-related oropharyngeal nonkeratinizing squamous cell carcinoma: characterization of a distinct phenotype. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod** 101(3): 339–345.
19. El-Mofty SK, Zhang MQ, Davila RM (2008) Histologic identification of human papillomavirus (HPV)-related squamous cell carcinoma in cervical lymph nodes: a reliable predictor of the site of an occult head and neck primary carcinoma. **Head Neck Pathol** 2(3): 163–168.
20. Evans MF, Matthews A, Kandil D, Adamson CS, Trotman WE, Cooper K (2011) Discrimination of 'driver' and 'passenger' HPV in tonsillar carcinomas by the polymerase chain reaction, chromogenic in situ hybridization, and p16(INK4a) immunohistochemistry. **Head Neck Pathol** 5(4): 344–348.
21. Eleuterio junior, J. et al. Associação entre a carga viral de HPV de alto risco, expressão de p16INK4a e lesões intra-epiteliais escamosas do colo uterino. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo , v. 53, n. 6, 2007.
22. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010) Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer** 127(12): 2893–2917.
23. Gao G, Chernock RD, Gay HA, Thorstad WL, Zhang TR, Wang H, Ma XJ, Luo Y, Lewis Jr JS, Wang X (2013) A novel RT–PCR method for quantification of human papillomavirus transcripts in archived tissues and its application in oropharyngeal cancer prognosis. **Int J Cancer** 132(4): 882–890.
24. Helt, A.M.;Funk, J.O.;Galloway, D.A. Inactivation of both the retinoblastoma tumor suppressor and p21 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is necessary to inhibit cell cycle arrest in human epithelial cells. **J Virol**, v.76, n.20, Oct, p.10559-68, 2002.
25. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, Hopman AH, Ramaekers FC, Speel EJ (2008) Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. **Int J Cancer** 122(12): 2656–2664.

26. Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, Henry H, Pfannenschmidt S, Burkhardt C, Gorogh T, Halec G, Hoffmann AS, Kahn T, Rocken C, Haag J, Waterboer T, Schmitt M (2012) HPV DNA, E6*I-Mrna expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? **Cancer Lett** 323(1): 88–96.
27. Holzinger D, Schmitt M, Dyckhoff G, Benner A, Pawlita M, Bosch FX (2012) Viral RNA patterns and high viral load reliably define oropharynx carcinomas with active HPV16 involvement. **Cancer Res** 72(19): 4993–5003.
28. Hong AM, Dobbins TA, Lee CS, Jones D, Harnett GB, Armstrong BK, Clark JR, Milross CG, Kim J, O'Brien CJ, Rose BR (2010) Human papillomavirus predicts outcome in oropharyngeal cancer in patients treated primarily with surgery or radiation therapy. **Br J Cancer** 103(10): 1510–1517.
29. Junor E, Kerr G, Oniscu A, Campbell S, Kouzeli I, Gourley C, Cuschieri K (2012) Benefit of chemotherapy as part of treatment for HPV DNA-positive but p16-negative squamous cell carcinoma of the oropharynx. **Br J Cancer** 106(2): 353 365.
30. Kim SH, Koo BS, Kang S, Park K, Kim H, Lee KR, Lee MJ, Kim JM, Choi EC, Cho NH (2007) HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. **Int J Cancer** 120(7): 1418–1425.
31. Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnert M, Claessen SM, Stenner M, Huebbers CU, Weissenborn SJ, Wedemeyer I, Preuss SF, Straetmans JM, Manni JJ, Hopman AH, Speel EJ (2009) Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. **Clin Cancer Res** 15(5): 1779–1786.
32. Kruse, A.J., Baak, J.P., Helliesen, T., Kjellevold, K.H., Robboy, S.J. Prognostic value and reproducibility of koilocytosis in cervical intraepithelial neoplasia. **Int J Gynecol Pathol.** 33(3), 236-9, 2003.
33. Kuo KT, Hsiao CH, Lin CH, Kuo LT, Huang SH, Lin MC (2008) The biomarkers of human papillomavirus infection in tonsillar squamous cell carcinoma-molecular basis and predicting favorable outcome. **Mod Pathol** 21(4): 376–386.

34. Laco J, Vosmikova H, Novakova V, Celakovsky P, Dolezalova H, Tucek L, Nekvindova J, Vosmik M, Cermakova E, Ryska A (2011) The role of high-risk human papillomavirus infection in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients: a clinicopathological and molecular study of 46 cases". **Virchows Archiv** 458(2): 179–187.
35. Lin et al.: Cyclin D1 overexpression is associated with poor prognosis in oropharyngeal cancer. **Journal of Otolaryngology – Head and Neck Surgery** 2013 42:23.
36. Liang, J., Mittal, K.R., Wei, J.J., Yee, H., Chiriboga, L., Shukla, P. Utility of p16 INK4a , CEA, Ki67, P53 and ER/PR in the differential diagnosis of benign, premalignant, and malignant glandular lesions of the uterine cervix and their relationship with Silversberg Scoring System for endocervical glandular lesions. **Int J Gynecol Pathol.** 26, 71-75, 2006.
37. Langendijk JA, Psyrri A (2010) The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. **Ann Oncol** 21(10): 1931–1934.
38. Lassen P, Overgaard J (2012) Scoring and classification of oropharyngeal carcinoma based on HPV-related p16-expression. **Radiother Oncol** 105(2): 269–270.
39. Leeflang MM, Deeks JJ, Takwoingi Y, Macaskill P (2013) Cochrane diagnostic test accuracy reviews. **System Rev** 2(1): 82–4053-2-82.
40. Lewis Jr JS (2012) P16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head Neck Pathol** 6(Suppl 1): S75–S82.
41. Lewis Jr JS, Khan RA, Masand RP, Chernock RD, Zhang Q, Al-Naief NS, Muller S, McHugh JB, Prasad ML, Brandwein-Gensler M, Perez-Ordonez B, El-Moft SK (2012) Recognition of nonkeratinizing morphology in oropharyngeal squamous cell carcinoma – a prospective cohort and interobserver variability study. **Histopathology** 60(3): 427–436.
42. Li W, Tran N, Lee SC, O'Brien CJ, Tse GM, Scolyer RA, Hong A, Milross C, Yu KH, Rose BR (2007) New evidence for geographic variation in the role of human papillomavirus in tonsillar carcinogenesis. **Pathology** 39(2): 217–222.

43. Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, Oggionni M, Rossini C, Cantu G, Squadrelli M, Quattrone P, Locati LD, Bergamini C, Olmi P, Pierotti MA, Pilotti S (2006) High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol** 24(36): 5630–5636.
44. Lindquist D, Ahrlund-Richter A, Tarjan M, Tot T, Dalianis T (2012) Intense CD44 expression is a negative prognostic factor in tonsillar and base of tongue cancer. **Anticancer Res** 32(1): 153–161.
45. Mccluggage W G. Immunohistochemical and functional biomarkers of value in female genital tract lesions. **Int J Gynecol Pathol.** 2006;25(2):101-20.
46. Mendez et al. A 10-year study of specimens submitted to oral pathology laboratory analysis: lesion occurrence and demographic features. **Braz Oral Res.** 2012 May-Jun;26(3):235-41.
47. Nam M. C. What Have We Learned From Human Papillomavirus-Positive Tumors? Trying to Connect Data About Biomarkers Among Human Papillomavirus-Related Squamous Cell Carcinomas. **Rev American Society of Clinical Oncology**, v 78, n 1. p1935–1941, 2009.
48. Nichols AC, Faquin WC, Westra WH, Mroz EA, Begum S, Clark JR, Rocco JW (2009) HPV-16 infection predicts treatment outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Otolaryngology** 140(2): 228–234.
49. O'Rourke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA (2012) Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. **Oral oncology** 48(12): 1191–1201.
50. Park WS, Ryu J, Cho KH, Choi MK, Moon SH, Yun T, Chun BS, Lee GK, Ahn HJ, Lee JH, Vermeer P, Jung YS (2012) Human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas in Korea: use of G1 cycle markers as new prognosticators. **Head Neck** 34(10): 1408–1417.
51. Preuss SF, Weinell A, Molito M, Stenner M, Semrau R, Drebber U, Weissenborn SJ, Speel EJ, Wittekindt C, Guntinas-Lichius O, Hoffmann TK, Eslick GD, Klussmann JP (2008) Nuclear survivin expression is associated with HPV-independent carcinogenesis and is not an indicator of poor prognosis in oropharyngeal cancer. **Br J Cancer** 98(3): 627–632.

52. Portari A L. Comparative analysis of oral cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human oral cancer. **Cancer Res** 2008; 63: 817380.
53. Quon H, Cohen MA, Montone KT, Ziobor AF, Wang LP, Weinstein GS, O'Malley BW Jr (2013) Transoral robotic surgery and adjuvant therapy for oropharyngeal carcinomas and the influence of p16 INK4a on treatment outcomes. **Laryngoscope** 123(3): 635–640.
54. Rocha L E. Immunocytochemistry in oral cancer: Analysis of clinical use. **Int J Cancer** , v.30, n 3, p. 234-239, 2007.
55. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stutzer H, Preuss SF, Hoffmann TK, Speel EJ, Dienes HP, Pfister HJ, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP (2007) Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. **Int J Cancer** 120(8): 1731–1738.
56. Reitsma JB, Glas AS, Rutjes AW, Scholten RJ, Bossuyt PM, Zwinderman AH (2005) Bivariate analysis of sensitivity and specificity produces informative summary measures in diagnostic reviews. **J Clin Epidemiol** 58(10): 982–990.
57. Robinson M, Sloan P, Shaw R (2010) Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing. **Oral Oncol** 46(7): 492–496.
58. Sousa, C.P. et al. [Presence of human papillomavirus in malignant oral lesions]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.35, n.5, Sep-Oct, p.439-44, 2007.
59. Syrjanen, K.J. et al. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. **Br J Oral Surg**, v.21, n.2, Jun, p.147-53,1983.
60. Piattelli, A. et al. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. **J Oral Maxillofac Surg**, v.60, n.5, May, p.532-40,2002

61. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Jones TM, Sheard J, Woolgar JA, Helliwell TR, Triantafyllou A, Robinson M, Sloan P, Harvey-Woodworth C, Sisson D, Shaw RJ (2011a) Evaluation of human papilloma vírus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. **Clin Cancer Res** 17(19): 6262–6271.
62. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH (2007) A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. **Int J Cancer** 121(11) 2465–2472.
63. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, Okpokam A Sloan P, Odell E, Robinson M (2011) Evaluation of human papilomavírus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. **J Clin Pathol** 64(4): 308–312.
64. Ukpo OC, Flanagan JJ, Ma XJ, Luo Y, Thorstad WL, Lewis JS Jr (2011) High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 35(9): 1343–1350.
65. Ukpo OC, Thorstad WL, Zhang Q, Lewis Jr JS (2012) Lack of association of cadherin expression and histopathologic type, metastasis, or patient outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a tissue microarray study. **Head Neck Pathol** 6(1): 38–47.
66. Xavier C. Natural history and epidemiology of HPV infection of oral and cervical cancer. **J Ginecology** 110 S4-S7- see form matter, 2005, Elsevier Inc.
67. Weinberger PM, Merkley MA, Khichi SS, Lee JR, Psyrris A, Jackson LL, Dynan WS (2010) Human papillomavirus-active head and neck câncer and ethnic health disparities. **Laryngoscope** 120(8): 1531–1537.
68. Weiss D, Koopmann M, Basel T, Rudack C (2012) Cyclin A1 shows agerelated expression in benign tonsils, HPV16-dependent overexpression in HNSCC and predicts lower recurrence rate in HNSCC independently of HPV16. **BMC Cancer** 12: 259–2407-12-259.

69. Westra WH (2012) The morphologic profile of HPV-related head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis, and clinical management. **Head Neck Pathol** 6(Suppl 1): S48–S54.
70. Westra WH (2009) The changing face of head and neck cancer in the 21st century: the impact of HPV on the epidemiology and pathology of oral cancer. **Head Neck Pathol** 3(1): 78–81.
71. Portari A L. Comparative analysis of oral cancer in women and in a human papillomavirus-transgenic mouse model: identification of minichromosome maintenance protein 7 as an informative biomarker for human oral cancer. **Cancer Res** 2008; 63: 817380.
72. Zhao N, Ang MK, Yin XY, Patel MR, Fritchie K, Thorne L, Muldrew KL, Hayward MC, Sun W, Wilkerson MD, Chera BS, Hackman T, Zanatio, AM, Grilley-Olson JE, Couch ME, Shockley WW, Weissler MC, Shores CG, Funkhouser WK, Olshan AF, Hayes DN (2012) Different cellular p16(INK4a) localisation may signal different survival outcomes in head and neck cancer. **Br J Cancer** 107(3): 482–490.
73. Zhang, L. et al. Comparison of HPV infection, p53 mutation and allelic losses in post-transplant and non-posttransplant oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v.31, n.3, Mar, p.134-41,2002.
74. Zhang, Z.Y. et al. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.33, n.1, Jan, p.71- 4,2004.
75. Zur hausen, H. Papillomavirus infections-a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta**, v.1288, n.2, Oct 9, p.F55-78, 2006

7. APÊNDICES

Apêndice 1: Dados brutos de número de registro da biopsia, sexo, idade, localização anatômica, diagnóstico histológico, escore de efeitos citopáticos de infecção viral e taxas médias de expressão imunoistoquímica de toda a amostra.

Biopsia	Sexo	Idade	Localização	Diagnóstico Histológico	Escore	P16	P16 (IT)*	Ciclina D1	Ciclina D1 (IT)*	Ki67
14/08	Masculino	50	Assoalho Bucal	HFE/Col	3	25%		0%		-
02/11	Feminino	57	Mucosa Jugal	HFE/Col	3	12%		16%		18%
12/11	Masculino	45	Mucosa Jugal	HFE/Col	3	31%		12%		-
14/11	Feminino	50	Rebordo Alveolar	HFE/Col	3	27%		24%		14%
14/12	Feminino	51	Língua	HFE/Col	2	23%		4%		-
16/12	Masculino	72	Mucosa Jugal	HFE/Col	1	2%		0%		-
08/13	Masculino	54	Assoalho Bucal	HFE/Col	3	1%		0%		-
15/13	Masculino	81	Rebordo Alveolar	HFE/Col	3	0%		0%		-
140/13	Feminino	62	Assoalho Bucal	HFE/Col	3	27%		20%		27%
149/13	Feminino	31	Mucosa Jugal	HFE/Col	4	34%		22%		21%
150/13	Feminino	53	Mucosa Jugal	HFE/Col	3	0%		0%		-
151/13	Masculino	14	Rebordo Alveolar	HFE/Col	3	23%		17%		34%
160/13	Masculino	61	Rebordo Alveolar	HFE/Col	3	2%		0%		-
169/13	Feminino	73	Rebordo Alveolar	HFE/Col	3	0%		0%		-
222/13	Feminino	59	Palato	HFE/Col	3	37%		23%		-
267/13	Masculino	63	Lábio	HFE/Col	4	24%		13%		-
295/13	Feminino	45	Rebordo Alveolar	HFE/Col	4	23%		15%		22%
301/13	Feminino	27	Palato	HFE/Col	4	25%		18%		24%
48/12	Feminino	41	Mucosa Jugal	HFE/Col	3	37%		14%		-
355/13	Feminino	43	Mucosa Jugal	HFE/Col	4	33%		28%		12%
174/13	Feminino	48	Mucosa Jugal	HFE/Col	4	29%		24%		34%
53/13	Feminino	40	Rebordo Alveolar	HFE/Col	3	12%		12%		37%
15/12	Feminino	46	Rebordo Alveolar	HFE/Col	3	21%		20%		-
04/12	Feminino	49	Rebordo Alveolar	HFE/Col	3	22%		18%		17%
68/08	Masculino	14	Assoalho Bucal	PO	3	23%		18%		
176/09	Feminino	23	Assoalho Bucal	PO	3	26%		12%		
180/09	Feminino	33	Lábio	PO	4	12%		16%		

09/08	Feminino	50	Assoalho Bucal	PO	3	18%		12%		
92/12	Feminino	41	Assoalho Bucal	PO	3	23%		12%		
170/12	Masculino	48	Assoalho Bucal	PO	3	13%		14%		
75/11	Masculino	65	Palato	PO	2	20%		15%		
193/12	Masculino	67	Língua	PO	3	16%		11%		
38/13	Feminino	44	Assoalho Bucal	PO	3	22%		20%		
11/13	Masculino	42	Assoalho Bucal	PO	3	21%		17%		
11/06	Masculino	50	Rebordo Alveolar	PO	3	21%		10%		
203/13	Masculino	59	Rebordo Alveolar	PO	3	24%		12%		
303/13	Masculino	52	Rebordo Alveolar	PO	3	30%		12%		
21/12	Feminino	55	Rebordo Alveolar	PO	3	18%		17%		
26/11	Feminino	53	Rebordo Alveolar	PO	3	21%		21%		
176/13	Feminino	56	Rebordo Alveolar	PO	4	28%		25%		
186/12	Masculino	31	Mucosa Jugal	CEC	4	69%	80%	33%	12%	33%
23/11	Feminino	24	Palato	CEC	5	71%	100%	30%	10%	-
07/13	Feminino	48	Língua	CEC	5	59%	56%	26%	13%	56%
85/13	Masculino	45	Língua	CEC	1	57%	89%	44%	23%	21%
13/11	Masculino	33	Palato	CEC	4	77%	80%	56%	11%	95%
17/13	Feminino	39	Palato	CEC	4	75%	94%	16%	14%	80%
169/09	Feminino	47	Língua	CEC	3	70%	100%	65%	15%	65%
185/13	Masculino	34	Lábio	CEC	3	50%	60%	37%	11%	83%
130/13	Feminino	36	Rebordo Alveolar	CEC	4	64%	0%	39%	10%	60%
274/13	Feminino	36	Rebordo Alveolar	CEC	2	0%	52%	4%	17%	56%
170/13	Feminino	47	Assoalho Bucal	CEC	1	55%	44%	49%	22%	51%
217/13	Feminino	41	Lábio	CEC	3	47%	100%	39%	20%	66%
313/13	Masculino	40	Assoalho Bucal	CEC	4	32%	81%	21%	18%	70%
93/13	Feminino	45	Assoalho Bucal	CEC	4	75%	23%	71%	22%	81%
82/14	Masculino	78	Lábio	CEC	2	0%	31%	0%	12%	-
54/13	Masculino	77	Mucosa Jugal	CEC	2	50%	0%	0%	9%	-
02/13	Masculino	69	Palato	CEC	1	12%	68%	0%	2%	-
01/13	Masculino	60	Mucosa Jugal	CEC	1	14%	70%	5%	12%	-
310/13	Masculino	80	Assoalho Bucal	CEC	4	51%	10%	34%	13%	-
266/13	Feminino	73	Rebordo Alveolar	CEC	1	1%	70%	0%	11%	-
271/13	Feminino	66	Rebordo Alveolar	CEC	2	4%	50%	0%	9%	-
269/13	Feminino	61	Mucosa Jugal	CEC	2	5%	70%	2%	3%	-
252/13	Feminino	67	Palato	CEC	1	5%	0%	7%	19%	-
163/13	Masculino	73	Língua	CEC	0	30%	61%	0%	11%	-

268/13	Feminino	71	Língua	CEC	0	7%	30%	2%	12%	-
232/13	Masculino	64	Língua	CEC	1	0%	0%	0%	11%	-
227/13	Feminino	60	Língua	CEC	2	2%	23%	0%	7%	-
206/13	Feminino	70	Língua	CEC	1	74%	8%	1%	12%	-
210/13	Feminino	83	Língua	CEC	1	0%	14%	0%	-	-
64/13	Masculino	12	Rebordo Alveolar	HFE	1	0%		3%		11%
189/13	Feminino	17	Língua	HFE	0	6%		9%		-
156/12	Feminino	34	Mucosa Jugal	HFE	0	0%		6%		15%
52/11	Feminino	34	Mucosa Jugal	HFE	0	0%		7%		18%
185/09	Masculino	56	Palato	HFE	0	4%		6%		-
128/09	Feminino	31	Rebordo Alveolar	HFE	0	0%		12%		-
178/09	Feminino	24	Rebordo Alveolar	HFE	0	0%		5%		42%
69/12	Masculino	53	Língua	HFE	0	5%		3%		31%
91/12	Masculino	28	Palato	HFE	1	1%		1%		-
42/13	Feminino	75	Língua	HFE	0	4%		9%		-
109/09	Feminino	43	Palato	HFE	0	0%		12%		-
115/09	Feminino	12	Mucosa Jugal	HFE	0	1%		3%		-
120/09	Masculino	08	Rebordo Alveolar	HFE	2	2%		13%		-
172/09	Masculino	45	Lábio	HFE	0	0%		8%		25%
121/09	Feminino	33	Lábio	HFE	0	0%		2%		28%
88/12	Masculino	22	Rebordo Alveolar	HFE	0	0%		10%		30%
114/12	Masculino	15	Palato	HFE	1	2%		4%		-
177/12	Feminino	67	Mucosa Jugal	HFE	0	0%		8%		-
163/12	Feminino	12	Rebordo Alveolar	HFE	1	0%		6%		14%
14/13	Feminino	41	Lábio	HFE	1	0%		15%		-

*(IT)=INTRATUMOR

Fonte: Laboratório de Patologia Bucal – Universidade Federal do Ceará

Apêndice 2: Parecer Consustanciado (CEP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESSQ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO CLÍNICO PATOLÓGICO E EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE P16, CICLINA D1 E KI67 EM LESÕES ORAIS ASSOCIADAS AO PAPILOMAVÍRUS HUMANO

Pesquisador: Ana Paula Negreiros Nunes Alves

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 12559413.0.0000.5054

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 255.612

Data da Relatoria: 25/02/2014

Apresentação do Projeto:

Serão selecionados pacientes portadores de lesões orais benignas associadas ao HPV e carcinoma de células escamosas orais cadastrados no Serviço de Biópsia do laboratório de Patologia Bucal do curso de Odontologia campus Fortaleza. Fragmentos de mucosa normal catalogados no banco de dados como hiperplasia fibroepitelial associadas a outras lesões serão utilizados como grupo controle. Dados do diagnóstico histopatológico referentes à localização anatômica da lesão, o sexo e a idade serão retirados dos laudos de biópsias dos pacientes. As lâminas correspondentes a cada lesão serão separadas e revistas por um patologista oral experiente. O tamanho da Amostra no Brasil: 72.

Serão realizados exames específicos para identificação da associação desses tumores com HPV.

Objetivo da Pesquisa:

PRIMÁRIO

Realizar um estudo clínico-patológico e expressão imunoistoquímica de p16, ciclina D1 e Ki67 em lesões orais associadas à infecção por HPV. Objetivos Secundários: Determinar a prevalência de lesões benignas e malignas em boca com provável associação com HPV, catalogar as lesões associadas ao papilomavírus humano encontradas em boca segundo as variáveis de sexo, idade e sítio anatômico, descrever os aspectos microscópicos sugestivos de infecção por HPV e comparar com a positividade do teste de imunoistoquímica para p16, correlacionar o aparecimento do câncer de boca com a positividade de p16 e possível presença de HPV, sugerir o diagnóstico de lesões com positividade simultânea para p16, ciclina D1 e Ki67.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Não haverá riscos, tendo em vista que o estudo de caráter retrospectivo, utilizará material de biópsias parafinadas não havendo participação direta dos indivíduos na pesquisa.

Benefícios

A perspectiva, comprovada a hipótese do trabalho, será de contribuir para uma maior atenção as infecções do HPV em cavidade oral, principalmente aquelas com potencial de transformação maligna, tendo em vista que o grupo mais suscetível, segundo a literatura científica atual, envolve pacientes jovens e do sexo feminino quando associado o Carcinoma de Células Escamosas (CEC) de Cavidade Oral e o HPV. Este perfil é discordante quando se estuda isoladamente o CEC, onde o mesmo é visto como mais incidente em indivíduos do sexo masculino, acima de 40 anos com histórico de consumo de drogas lícitas (fumo e álcool). Sabe-se também que as práticas sexuais contemporâneas sem o uso do preservativo contribuem para a disseminação das infecções do HPV em mucosa oral, genital e anal. Medidas de controle de infecção, portanto, são válidas e tema intenção de prevenir o contágio e consequentemente o aparecimento dessas lesões. Diante do exposto vemos que o HPV se apresenta como uma infecção viral comum em indivíduos com vida sexual ativa, sabendo-se que a diversidade de lesões associadas ao vírus pode ter desde um comportamento inócuo como podem contribuir para o surgimento do câncer, medidas de controle desta infecção devem ser adotadas, principalmente para os grupos que forem considerados vulneráveis.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O PROJETO É RELEVANTE, A METODOLOGIA É ADEQUADA E ATENDE AO QUE ESTÁ POSTO NA RES. 96/96 E CORRELATAS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

ORÇAMENTO FINANCEIRO, FOLHA DE ROSTO, AUTORIZAÇÃO DA CHEFIA DO LABORATORIO DE PATOLOGIA, TERMO DE DISPENSA DO TCLE, TERMO DE FIEL DEPOSITÁRIO, OFICIO DE ENCAMINHAMENTO E CURRICULUM VITAE foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Não há recomendação específica.

Endereço: Rua Cel. Nunes de Melo, 1127

Bairro: Rodolfo Teófilo

CEP: 60.430-270

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3366-8344

Fax: (85)3223-2903

E-mail: comepe@ufc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DO
CEARÁ/ PROPESQ



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto deve ser aprovado, s.m.j. desse comitê.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FORTALEZA, 25 de Fevereiro de 2014

Assinador por:

FERNANDO ANTONIO FROTA BEZERRA
(Coordenador)