
NEOPLASIAS DA CAVIDADE ORAL E VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO

Resultados da componente virulógica do estudo*

José Augusto Aleixo Dias¹, Ana Maria Costa Miranda², Paula Gameiro Costa³,
Pedro Soares Oliveira⁴, Daniel Sousa⁵, José Marinho Falcão⁶

RESUMO: A etiologia dos tumores da cavidade oral é complexa. Para além dos factores genéticos e comportamentais como o consumo de álcool e tabaco, tem sido referida ultimamente a importância dos vírus DNA, nomeadamente os Vírus do Papiloma Humano. Com o objectivo de esclarecer a importância relativa dos vários factores de risco na etiologia dos tumores da cavidade oral, conduziu-se um estudo caso-controlo que envolveu 289 casos e controlos que foram submetidos a uma entrevista sobre aspectos de caracterização pessoal e comportamental, bem como, à recolha de material por citologia exfoliativa da cavidade oral. Destes efectivos foi seleccionado aleatoriamente um sub-grupo de 22 casos e 19 controlos tendo as respectivas amostras sido purificadas e amplificado o material recolhido por PCR, visando a detecção do DNA viral. A detecção do genoma do VPH foi negativa em todas as mostras consideradas. Após revisão de lâminas, recolheu-se material dos mesmos doentes, tendo sido efectuada hibridação *in situ* que confirmou a inexistência de vírus do papiloma humano. Atendendo à selecção aleatória da amostra utilizada – embora de reduzida dimensão – à tecnologia empregue e ao cuidado de validação do método, os resultados virulógicos configuram uma reduzida importância dos VPH na etiologia dos tumores da cavidade oral na população portuguesa que ocorre ao IPOFG. Os achados referentes aos restantes factores de risco foram consistentes com os referidos por vários autores, nomeadamente no que diz respeito ao álcool, tabaco, baixo nível sócio-cultural e má vigilância da saúde oral dos doentes.

ABSTRACT: Oral cancer aetiology is complex. Apart from the roles of smoking, drinking and genetic susceptibility, some evidence of the involvement of DNA virus, namely some Papillomaviruses, have been reported lately. A case-control study was conducted to examine the associations between some risk factors and

* Projecto subsidiado pela Comissão de Fomento da Investigação em Cuidados de Saúde, do Ministério da Saúde – Projecto n.º 112/92.

¹ Divisão de Epidemiologia e Bioestatística da Direcção-Geral da Saúde, Lisboa.

² Registo Oncológico Regional Sul – Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, Lisboa.

³ Serviço de Virologia – Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, Lisboa.

⁴ Serviço de Patologia Morfológica – Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, Lisboa.

⁵ Serviço de Cirurgia I – Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil, Lisboa.

⁶ Centro de Epidemiologia – Instituto Nacional de Saúde, Lisboa.

oral cancer, at the IPOFG. Out of 156 cases and 133 controls that were interviewed, a random sample of exfoliated oral cavity cells from 22 tumor patients and 19 controls were tested for the presence of HPV-DNA by polymerase chain reaction method. None was positive. Tissue hybridisation technique performed on the correspondent biopsy material from the same cases and controls was also negative. This findings are in favour of a limited role of the HPV in oral cancer aetiology among the Portuguese population referring to the IPOFG.

Palavras-chave: Tumores, Cavidade Oral, Vírus do Papiloma Humano.

Key-words: Tumors, Oral Cavity, Risk Factors, Human Papillomaviruses.

Dias JAA e Col. Neoplasias da cavidade oral e vírus do papiloma humano. Resultados da componente virulógica do estudo. Rev. Port. de Est. e Cir. Maxilofac. 1995; Vol. 36 (2): 83-89

1 – INTRODUÇÃO

Os tumores da cavidade oral têm uma etiologia complexa. Está descrita e fundamentada a importância do tabaco, bebidas alcoólicas, susceptibilidade genética sendo mais controversa a contribuição viral. Os Vírus do Papiloma Humano (VPH) podem induzir a proliferação epitelial (1,2,3,4,5) e transformar algumas células em fenótipos malignos *in vitro* e *in vivo*, precisando para este seu efeito carcinogénico de cofactores, nomeadamente do tabaco e álcool (6). Apesar da heterogeneidade dos VPH, apenas tem sido possível identificar alguns deles num pequeno número nos carcinomas (7,8,9), o que faz pensar em potenciais oncogénicos distintos para os seus diferentes tipos. Por outro lado, a presença dos VPH tanto pode ser anterior ou concomitante com o desenvolvimento do tumor, ou surgir na sequência da degradação do sistema imunitário provocado pelo mesmo ou paralelo com determinados processos terapêuticos coadjuvantes o que complica o processo de determinação da sua importância relativa. Em Portugal não se conhecem estudos que tenham estimado a prevalência de VPH nas lesões tumorais da cavidade oral, e/ou avaliado o risco de vir a sofrer de neoplasias desta localização associadas à exposição ao vírus, bem como, a outros determinantes importantes de risco. A necessidade de conhecer melhor a etiologia dos tumores desta localização, face às características particulares e comportamentais da população que ocorre ao Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil (IPO-

FG), bem como a elevada letalidade dos tumores desta localização primitiva motivou o presente estudo.

2 – OBJECTIVO DO ESTUDO

O estudo pretendeu determinar a importância dos vírus do papiloma humano, bem como de outros factores de risco, na ocorrência de tumores malignos da cavidade oral na população que ocorre ao IPOFG, em Lisboa.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

O carácter relativamente pouco frequente das neoplasias malignas da cavidade oral, aliado ao período mais ou menos longo que se julga decorrer entre a generalidade das exposições estudadas e o aparecimento da doença, fez-nos optar pelo modelo **retrospectivo de tipo "caso-controlo"**. Assim, os "casos" foram seleccionados entre os indivíduos a quem foram diagnosticadas, pela primeira vez, neoplasias malignas da cavidade oral nas consultas de Cirurgia 1 e Estomatologia do IPOFG e que, cumpriam os critérios de inclusão estabelecidos, a partir dos relatórios da Anatomia Patológica. Os "controles" foram constituídos por indivíduos que, tendo frequentado as mesmas consultas, não apresentaram lesões malignas, nem foram excluídos, em função dos critérios estabelecidos.

3.1.1 – Critérios de inclusão dos casos:

- Terem diagnóstico de neoplasia maligna da cavidade oral, efectuado pelos serviços do IPOFG com confirmação histológica;
- serem casos incidentes (casos novos).

3.1.2 – Critérios de exclusão dos casos:

- Haver conhecimento de terem sido submetidos a terapêutica antivirais, radioterapia, quimioterapia ou imunoterapia, passíveis de alterar os resultados das análises histocitológicas;
- não estarem em condições, físicas ou psíquicas, de poderem dar respostas coerentes ao questionário a administrar;
- recusarem a participação no estudo.

3.2.1 – Critérios de inclusão dos controlos

- Terem frequentado as consultas onde os casos foram identificados;
- não sofrerem, ou terem sofrido, de lesões malignas de qualquer localização.

3.2.2 – Critérios de exclusão dos controlos:

- Serem portadores de lesão reconhecidamente pré-maligna;
- Sofrerem ou terem sofrido, de tumores malignos de qualquer localização;
- Tenham sido alguma vez submetidos a terapêuticas antivirais, radioterapia, quimioterapia, ou imunoterapia;
- Não estarem em condições físicas ou psíquicas para poderem dar respostas coerentes, ao questionário administrado;
- Recusarem a participação no estudo.

3.3 – Dimensão da amostra

Não se conhecia exactamente a prevalência de exposição ao vírus do papiloma humano na popula-

ção portuguesa. Com base nos registos de incidência dos tumores da cavidade oral de indivíduos que acorreram ao IPOFG em 1989, esta foi referida em cerca de 10% dos casos. Estimou-se a dimensão mínima da amostra assumindo um OR de 3.5, 10% como proporção de expostos na população, um erro do Tipo I de 0.05 e um erro do Tipo II de 0.10. Nesta base, seria necessário recolher informação sobre um mínimo de 98 casos e 98 controlos (10). Contudo, a presença de múltiplas variáveis de confundimento, como o sexo, a idade, os consumos de álcool e tabaco, fazem com que tenhamos apontado para uma amostra superior à estimada, de modo a salvaguardar a robustez da mesma, face às previsíveis estratificações.

3.4 – Técnica de identificação dos VPH

Atendendo aos elevadíssimos custos dos primers e sondas destinados a tipar cada um dos vírus em estudo (VPHs: 6,11,16 e 18), decidiu-se submeter todas as amostras a um "screening" prévio para se saber se continham, ou não, DNA viral.

3.4.1 – Detecção do genoma do HPV por PCR (Polimerase Chain Reaction)

A colheita de material para análise efectuou-se a partir de esfregaços bocais realizados com "cyto-brush" (citologia esfoliativa) efectuada nos casos e nos controlos, independentemente de nos primeiros se realizarem, também, os exames histológicos habituais a partir de tecidos oriundos da biópsia da lesão e regiões envolventes. Depois da colheita dos esfregaços e da entrevista, efectuados por pessoal treinado para o efeito e executados no Registo Oncológico Regional Sul (ROR Sul), as amostras foram colocadas em tubos cónicos de 15 ml contendo 2 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline) estéril com antibióticos (100 ml de penicilina, 100 ug/ml de Estreptomina, 500 U/ml de Micostatin) que foram enviados, juntamente com as respectivas lâminas, aos laboratórios de Virulogia e Patologia, devidamente catalogados e acondicionados.

3.4.1.1 – Extracção do DNA

O método utilizado não envolve purificação extensa dos ácidos nucleicos. O sedimento obtido por centrifugação a 2000-3000 rpm durante 5 minutos em centrífuga de bancada, após ser retirado cuidadosamente por aspiração, o sobrenadante. Ressuspendeu-se de seguida o sedimento em 300 ul de tampão PCR (50 mM KC, 10 mM TrisCl pH 8.3, 2.5 mM MgCl₂, ao qual foi adicionado 0.5% de Tween 20). A digestão proteica foi efectuada por adição de 100 ug/ml de Proteinase K e incubação a 55°C durante 1 hora, em microtubo de 1.5 ml. Seguidamente inactivaram-se as proteases por incubação a 95°C, durante dez minutos. A quantificação do DNA foi feita espectrofotometricamente, tendo-se utilizado em cada reacção PCR entre 0.5-1.0 ug de DNA.

3.4.1.2 – PCR (Polimerase Chain Reaction)

O DNA extraído das amostras foi posteriormente amplificado por PCR, para o que se utilizaram um par de *primers* de consenso: MY09 e MY1 (1 da Perkin Helmer Cetus). A região do genoma viral amplificada está inserida no ORF (Open Reading Frame) L1. O ORF L1 é uma das regiões mais conservadas entre os genomas dos diferentes HPV's. O par de *primers* utilizado, amplifica um fragmento de aproximadamente 450bp (*base pairs*), comum a cerca de 25 HPV's distintos. Por cada amostra foi feita, simultaneamente, a amplificação do gene humano da B-Globulina. Este controlo permitiu-nos saber se o DNA da amostra era ou não amplificável. O par de *primers* utilizado, promove a amplificação de um fragmento de aproximadamente 268 bp.

Paralelamente, foram efectuados um controlo positivo e um controlo negativo da técnica de amplificação. O controlo positivo consistiu na amplificação do DNA obtido a partir de um esfregaço genital, positivo para o HPV 16/18 pela técnica de Hibridação *in situ*. Como controlo negativo, utilizou-se DNA purificado a partir da linha celular H9 (linfócitos humanos), negativa para HPV. As reacções de amplificação foram efectuadas num aparelho da Perkin Helmer

Cetus. A amplificação foi iniciada com uma desnaturação a 95° durante 2 minutos, seguida de 30 ciclos. Cada ciclo foi programado para começar com uma desnaturação do DNA a 95° durante 30 segundos, seguida de reacção da ligação dos primers a 55°, 30 segundos e por fim, pela síntese do DNA a 72° durante 10 minutos.

3.4.1.3 – A amplificação do genoma do HPV:

A 10 ul de suspensão de DNA (0.5-1.0 ug) adicionou-se a mistura de reacção contendo: 200 uM de cada dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), 0.5 uM de cada primer (MY09 e MY11), 8 mM de MgCl₂, 10 mM de TRIS CL pH 8.5, 50 mM KCl, 2.5 U Taq polimerase e H₂O, até perfazer 100 ul. Esta solução foi coberta com 80 ul de óleo mineral para evitar a evaporação durante a reacção de amplificação.

3.4.1.4 – Amplificação do gene da B-Globulina:

Mantiveram-se exactamente os mesmos reagentes e respectivas concentrações, com excepção do par de primers utilizado: 50 nM do primer PC04 e 50 nM do primer GH20. Os produtos amplificados foram analisados através de uma electroforese em gel de agarose (NuSieve, da FMC) a 4%, em tampão TAE 1x (Tris Acetato EDTA) com Brometo de Etídio (0.5 ug/ml). Todos estes procedimentos foram desenvolvidos e aplicados às amostras seleccionadas nos doentes identificados, durante o primeiro ano do estudo (1992-93), tendo a detecção do genoma viral sido negativa para todas as amostras consideradas.

3.4.2 – Hibridação *in situ*

Atendendo ao facto de que o rastreio aos vários HPV's efectuado no primeiro ano do projecto não ter permitido demonstrar a existência de DNA dos referidos vírus no material recolhido a partir de esfregaço, decidiu-se estudar as peças recolhidas nos mesmos doentes, de forma a validar a informação obtida. De facto, poderia acontecer não se encontrarem vestígios de DNA viral no esfregaço, mas os vírus

estarem presentes nas lesões. Daí que se tenha pesquisado num segundo tempo, nas peças biopsadas ou excisadas dos referidos doentes, se existiam elementos que fundamentassem a presença de VPHs. Para tanto seleccionaram-se as lâminas dos doentes estudados e seus controlos, efectuou-se a revisão das referidas lâminas e procedeu-se à hibridação *in situ*. O método baseou-se na utilização de sondas biotiniladas para os HPVs 6/11 e 16/18, que cobria igualmente os HPVs 31/33/35, nas secções de tecido fixado em formol, incluído em parafina e com uma espessura média de 4-5 μ (11,12,13).

A técnica utilizada foi a seguinte:

- desparafinou-se com xilol, desidratou-se com álcool absoluto e secou-se ao ar;
- incubou-se numa solução de digestão durante 15 minutos a 37°;
- lavou-se em tampão durante 1 minuto;
- desidratou-se em álcool, a 95°, durante 1 minuto, seguido de álcool a 100° durante 1 minuto;
- secaram-se as lâminas ao ar;
- misturou-se a sonda do HPV com a sonda de controlo;
- incubou-se a secção cobrindo o corte com uma lamela;
- continuou-se a incubação em câmara húmida;
- lavaram-se as lâminas em tampão pré-aquecido;
- juntaram-se 40 μ l do "reagente de detecção", indo a incubar durante 20';
- lavou-se em tampão durante 3 minutos, indo a incubar em substracto a 37° durante 60 minutos;
- após lavagem com água destilada, foram a contrastar com "nuclear fast red" durante 30 a 60 segundos;
- após nova lavagem e desidratação em álcool a 95° e 100°, clarificou-se em xilol;

De cada amostra foram efectuados:

- controlo positivo
- controlo negativo
- incubação com a sonda

4 – RESULTADOS

4.1 – Da detecção do DNA viral por PCR

Após electroforese dos produtos identificados e subsequente visualização do gel sob iluminação ultravioleta, nenhuma amostra apresentou banda de DNA a nível dos 450 bp. Testaram-se durante o último trimestre de 1992, 41 amostras, correspondendo 22 a esfregaços orais referentes a "casos" e 19 amostras referentes a "controlos". As amostras foram divididas em quatro lotes e para todas elas foi efectuado o controlo da presença de DNA pela beta-globina. Em todas as amostras analisadas, a detecção do genoma viral foi negativa.

4.2 – Da hibridação *in situ*

Todas as amostras objecto do estudo, com confirmação a partir da revisão de lâminas foram negativas. As amostras controlo utilizadas foram positivas. Não foi possível, portanto, confirmar ou infirmar a potencial associação dos vários VPHs em estudo com os tumores de localização primitiva na cavidade oral, uma vez que, nem nos casos nem nos seus controlos foram identificados genomas do DNA viral.

Estes achados foram consistentes, quer a partir de esfregaço oral, quer por detecção efectuada a partir de tecido biopsado e/ou excisado. Atendendo à alta tecnologia utilizada e ao cuidado de validação dos métodos e procedimentos empregues, apesar da reduzida dimensão da amostra estudada, os resultados apontam para uma reduzida importância dos VPH na etiologia dos tumores da cavidade oral na população portuguesa. De facto, outros factores sociais e comportamentais parecem assumir uma maior relevância.

5 – CONCLUSÕES

Ressalta da análise dos resultados dos exames efectuados, que:

- Não parece existir na população portuguesa que

acorre às consultas do IPOFG em Lisboa uma prevalência relevante de HPVs na cavidade oral, não tendo sido encontrado material genético dos referidos vírus nos utentes com tumores desta localização primitiva, nem nos seus controlos;

- Esta circunstância inviabilizou o estudo que visava determinar a potencial associação entre estes vírus e a doença maligna da cavidade oral, pelo facto de nem os casos nem os controlos terem material genético viral nos esfregaços recolhidos nem nas peças biopsadas ou excisadas;
- O cuidado metodológico e a validação das técnicas efectuadas permite-nos assegurar que, se ele existisse, teria sido identificado;
- Com base nos dados recolhidos por entrevista a casos e controlos, a idade, o sexo, o consumo de tabaco, o consumo de álcool, o baixo grau de escolaridade e as profissões menos diferenciadas e uma irregular vigilância da saúde oral, constituem variáveis em que a associação entre a doença e os determinantes de risco se revelaram estatisticamente significativas;

6 - DISCUSSÃO

Os dados preliminares da investigação que aqui se apresentam têm a ver, apenas, com a componente análise laboratorial do estudo. Para salvaguardar a qualidade da técnica laboratorial e dos primers utilizados na identificação dos VPH, testaram-se os procedimentos em material de biópsia ginecológica que se sabia infectado pelos vírus papiloma humanos e a resposta foi francamente positiva. Procedeu-se, ainda, à revisão das lâminas para verificar se existiam imagens sugestivas de infecção viral – o que se revelou negativo. O controlo da técnica de hibridação *in situ* foi igualmente efectuado, tendo a validação sido excelente. Podemos portanto afirmar que, tendo por base esses dados preliminares, o álcool, o tabaco, o baixo nível cultural e a fraca vigilância da saúde oral, parecem ser os principais determinantes de risco do cancro oral.

AGRADECIMENTO:

Os autores exprimem o seu agradecimento ao sr. Prof. Dr. Jorge Soares que apoiou o desenvolvimento da investigação, aos técnicos e funcionários do Serviço de Patologia Morfológica e Virulogia do IPOFG, nomeadamente ao Sr. Daniel Piscarreta, bem como, do Registo Oncológico Regional Sul, nomeadamente aqueles que conduziram as entrevistas e procederam à recolha do material para citologia esfoliativa, D. Maria Beatriz, Lurdes Pereira e Célia Maria.

7 - BIBLIOGRAFIA

1. SHAH K, KASHIMA H, POLK BF, SHAH F, ABBEY H, ABRAMSON A – "Rarity of cesarian delivery in cases of juvenile-onset respiratory papillomatosis" – *Obstet. Gynecol*; 1986 Dec., 68(6):795-9.
2. SINGER A, CAMPION MJ, MCCANCE DJ – "Human papillomavirus" – *Br. J. Hosp. Med.*, 1985 Aug., 34 (2):104-8.
3. HELMUTH RA., STRATE RW – "Squamous carcinoma of the lung in a non irradiated, nonsmoking patient with juvenile laryngotracheal papillomatosis" – *Am. J. Surg. Pathol.*, 1987 Aug., 11(8):634.
4. WECK PK, BRANDSMA JL, WHISNANT JK – "Interferons in the treatment of human papillomavirus diseases" – *Cancer-Metastasis Rev*, 1986, 5(2):139-65.
5. MOUNTS P, SHAH KV – "Respiratory papillomatosis: etiological relation to genital tract papillomaviruses" – *Prog. Med. Virol.*, 1984, 29:90-114.
6. STEELE C, SHILLITOE EJ – "Viruses and Cancer", *Critical reviews in Oral Biology and Medicine*, 1991, 2(2):153-175.
7. OMS – "Infecciones genitales por papilomavirus humanos y cáncer: Memorandum de una reunión de la OMS", *Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana*, Vol. 105, n.º 2:120-138.
8. DEMETRICK DJ, INOUE M et al – "Human papillomavirus type 16 associated with oral squamous carcinoma in a cardiac transplant recipient", *Cancer* – 1990, 66(8):1726-31.
9. MADEN C. et al – "Human papillomaviruses, Herpes Simplex Viruses and the risk of Oral Cancer in Men", *American Journal of Epidemiology*, 1992, Vol. 135, N.º 10:1093-1102.
10. SCHLESSELMAN JJ – "Case-control studies: design, conduct, analysis", 1982, Oxford University Press.
11. LONING T, MEICHNER M, MILDE-LANGSHOK K et al – "HPV DNA detection in tumors of the head and neck: a comparative light microscopy and DNA hybridization study" – *ORL J. Otorhinolaryngology Relat. Spec.*, 1987, 49(5):259-69.
12. SYRJANEN SM, SYRJANEN KJ, LAMBERG MA – "Detection of human papillomavirus DNA in oral mucosal

NEOPLASIAS DA CAVIDADE ORAL E
VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO

lesions, using in situ DNA-hybridization applied on paraffin sections" – Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol., 1986, 62:660-667.

13. SYRJANEN K, GISSMANN L, KOSS LG – "Papillomaviruses and human disease", 1987, Springer-Verlag, Germany.