



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**CORRELAÇÃO E PREVALÊNCIA DE LESÕES DE HPV  
POSITIVAS EM POPULAÇÕES JOVENS, EM MEDICINA DE  
CABEÇA E PESCOÇO**

Trabalho submetido por

**Mafalda Maltezinho Bicha**

Para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Junho de 2014**





**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**CORRELAÇÃO E PREVALÊNCIA DE LESÕES DE HPV  
POSITIVAS EM POPULAÇÕES JOVENS, EM MEDICINA DE  
CABEÇA E PESCOÇO**

Trabalho submetido por

**Mafalda Maltezinho Bicha**

para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por

Prof.Doutor José Silva Marques

**Junho de 2014**



## **1.1. DEDICATÓRIA**

Dedico esta dissertação meus pais...

## AGRADECIMENTOS

Pela impossibilidade de citar os nomes de todos os que me apoiaram e colaboraram direta e indiretamente na realização desta monografia e, sobretudo, para não correr o risco de algum esquecimento injusto, começo por exteriorizar o meu agradecimento a todos aqueles sem os quais esta monografia não seria possível. Não quero, todavia, deixar de salientar algumas pessoas ou instituições às quais devo especial gratidão:

Ao Professor Doutor José Silva Marques, meu orientador, pelo apoio, motivação e total disponibilidade.

À biblioteca do Instituto Superior das Ciências da Saúde Egas Moniz, por todos os recursos que me disponibilizaram para executar esta pesquisa exaustiva.

Aos meus colegas e amigos, que me acompanharam durante este percurso de cinco anos.

Ao Nuno, pelo apoio e encorajamento incondicional ao longo deste percurso.

## **RESUMO**

A infecção pelo vírus Papiloma humano é um conceito atual que tem vindo a despertar a atenção da população no geral, e assim surgiu a ideia de explorar essa temática.

Esta monografia tem como objetivo reunir os conhecimentos mais atuais sobre o tema.

Inicia-se com a apresentação do vírus HPV relatando, particularmente os tipos de vírus, as suas características, os fatores de risco associados à infecção, as formas de transmissão, os diferentes métodos de deteção e os aspetos clínicos das infeções por HPV. Seguidamente introduz-se os tipos de vírus que estão associados à mucosa oral normal ou infetada e as lesões pré malignas que podem advir dessas infeções.

Considerando que a infecção pelo HPV está muito associada ao desenvolvimento de carcinomas espinocelulares, desenvolve-se essa associação e os tipos de tratamentos que existem. Segue-se um capítulo sobre as diferenças que existem na prevenção e rastreio atualmente entre os países desenvolvidos e em desenvolvimento. Por fim, desenvolve-se um capítulo sobre a vacinação existente e a sua contribuição para a redução da incidência da infecção pelo vírus HPV na população.

**Palavras-chave:** HPV, carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, Papilomavírus humano, cancro oral

## ABSTRAT

Infection by the human papilloma virus is a current concept that has come to awaken the attention of the general population, and so the idea of exploring this theme emerged.

This monograph aims to bring the most current knowledge on the subject.

It begins with the presentation of the HPV virus reporting, particularly viruses, their characteristics, risk factors associated with infection, modes of transmission, the different methods of detection and clinical aspects of infection by HPV . Then introduces the types of viruses that are associated with normal or infected oral mucosa and pre malignant lesions that may result from those infections.

Whereas HPV infection is highly associated with the development of squamous cell carcinomas, the association develops and the types of treatments that exist. The following is a chapter about the differences that exist in the current prevention and screening among developed and developing countries. Finally, it develops a chapter on the existing vaccination and their contribution to reducing the incidence of infection by HPV in the population.

**Key words:** HPV, squamous cell carcinoma of the head and neck, human papillomavirus, oral cancer

## INDICE

1. Introdução.....	12
2. Desenvolvimento.....	15
2.1. Papilomavírus Humano.....	15
2.1.1. Características do vírus.....	15
2.1.2. Fatores de risco para carcinogênese .....	18
2.1.3. Co-fatores .....	19
2.1.4. Filogenética .....	19
2.1.5. Epidemiologia.....	21
2.1.6. Fatores de risco para a obtenção da infecção .....	23
2.1.7. Influência Geográfica da distribuição de HPV .....	23
2.2. FORMAS DE TRANSMISSÃO DO HPV .....	23
2.2.1. Replicação do vírus HPV .....	26
2.2.2. Patogênese e Imunidade do vírus HPV .....	28
2.3. Métodos para detecção do HPV .....	29
2.3.1. Métodos para a obtenção de amostras .....	30
2.3.2. Testes para a detecção de DNA ou RNA de HPV .....	33
2.3.3. Teste Cobas® (pesquisa de DNA de alto risco) .....	37
2.3.4. Teste Clart STI® (genotipagem completa de DNA de HPV) .....	39
2.4. Manifestações Clínicas da infecção por HPV .....	39
2.5. Aspectos clínicos das lesões orais por HPV .....	54
2.6. Associação dos tipos de HPV com as lesões orais .....	56
2.7. Implicações da presença de DNA de HPV na mucosa oral normal.....	57
2.8. HPV e as lesões orais pré-malignas .....	58
2.9. Associação do Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço com o HPV ...	59
2.9.1. Incidência e epidemiologia.....	59
2.9.2. Etiologia e fatores de risco .....	62
2.9.3. Biologia e apresentação clínica .....	65
2.9.4. Estadiamento .....	67
2.9.5. Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço relacionado com o HPV e respetivo tratamento .....	70
2.9.6. HPV e a radiosensibilidade .....	75
2.10. O vírus da imunodeficiência humana (HIV) e as infecções pelo papilomavirus humano .....	77

2.10.1.	Futura direção do tratamento .....	79
2.10.2.	Estratégias de prevenção em países desenvolvidos e em desenvolvimento.....	80
2.11.	Vacinação .....	81
2.11.1.	Vacina Bivalente .....	83
2.11.2.	Vacina tetravalente .....	84
2.11.3.	Vacinação nos jovens rapazes e homens .....	85
2.11.4.	A vacinação e a medicina dentária.....	86
2.11.5.	Vacinação contra a infeção por HPV em Portugal .....	88
3.	Conclusões .....	92
4.	Bibliografia.....	94

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa genómico do HPV 16.....	17
Figura 2: Estrutura tridimensional do papilomavírus humano .....	18
Figura 3: Árvore que demonstra os diferentes grupos existentes para os diferentes tipos de HPV .....	20
Figura 4: Ciclo replicativo do HPV.....	26
Figura 5: Expressão fenotípica da infecção po HPV .....	27
Figura 6: Localização dos principais estádios do ciclo de vida do HPV no epitélio pavimentoso (escamoso).....	29
Figura 7: Exemplo de escova para obter amostras esfoliativas .....	30
Figura 8: Exemplificação do modo de utilização do Rovers® Orcellex® no bordo lateral da língua, na mucosa jugal, na gengiva e no pavimento da boca).....	31
Figura 9: Exemplo de biopsia.....	31
Figura 10: Esquema dos testes de Southern blotting.....	34
Figura 11: Esquema de teste de Dot blotting .....	35
Figura 12 Esquema da reação de hibridização in situ .....	36
Figura 13: Esquema da reação em cadeia da polimerase (PCR). .....	37
Figura 14: Imagem do instrumento Colposcópico. ....	38
Figura 15: Verruga vulgar no dorso do terceiro quirodáctilo direito. ....	42
Figura 16: Verruga Vulgar em criança. ....	42
Figura 17: Imagem ilustrativa de uma verruga Plantar e de uma verruga em mosaico. ....	43
Figura 18: Verruga plana no tornozelo.....	44
Figura 19: Verruga filiforme em recetor de transplante renal. ....	44
Figura 20: Verruga Filiforme na face. ....	45
Figura 21: Verruga pigmentada .....	45
Figura 22: Verrugas planas epidermodisplasia verruciforme-símiles no recetor de transplante renal .....	47
Figura 23: Lesões verrucosas em Epidermodisplasia Verruciforme. ....	47
Figura 24: Aspeto do lábio inferior de uma criança com 7 anos, do sexo masculino com doença de Heck.....	50
Figura 25: Hiperplasia epitelial focal ou doença de Heck em criança indígena do Parque Indígena do Xingu. ....	50
Figura 26: Imagem ilustrativa de cancro do colo do útero .....	53
Figura 27: Papiloma no bordo esquerdo da úvula .....	55
Figura 28: Carcinoma espinocelular oral no rebordo alveolar. ....	55
Figura 29: Leucoplasia da Língua. ....	56
Figura 30: Embalagem da vacina cervarix. ....	84
Figura 31: Embalagem da vacina Gardasil.....	85
Figura 32: Cobertura vacinal para a 3ª dose da vacina HPV em jovens nascidas em 1995, por ARS. Avaliação 2013, Continente. ....	90

## INDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Número de pesquisas de artigos sobre Papilomavirus na base de dados <i>PubmedMedline</i> 's pelo ano de publicação .....	12
Gráfico 2: Taxas de incidência de diversos cancros .....	57
Gráfico 3: Cobertura vacinal por coorte e número de dose, no âmbito do PNV. Avaliação 2013, continente .....	85
Gráfico 4: Cobertura vacinal por coorte e número de doses, no âmbito da Campanha (2009 a 2011). Avaliação 2013, continente.....	87

## INDICE DE TABELAS

Tabela 1: Principais manifestações clínicas causadas por diferentes tipos de HPV. ....	50
Tabela 2: Diferenças entre o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço HPV positivo e HPV negativo.....	63
Tabela 3: Estadiamento do tumor primário. ....	64
Tabela 4: Gânglios Linfáticos Regionais (N). ....	65
Tabela 5: Metástases à Distância. ....	65
Tabela 6: Grupos de Estadiamento. ....	66
Tabela 7: Critérios de irresecabilidade .....	67
Tabela 8: Diferença de resultados clínicos entre os tumores HPV-positivo e HPV-negativos.....	69

## **2. INTRODUÇÃO**

O HPV é a abreviatura utilizada para identificar o Papilomavírus Humano, causador do condiloma acuminado (do grego KONDILUS = tumor redondo e do latim *acuminare* = tornar pontiagudo). (Castro & Bussoloti Filho, 2006)

A infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) é uma das mais comuns doenças sexualmente transmitidas em adolescentes sexualmente ativos e jovens do mundo. Todos os homens e mulheres sexualmente ativos estão sujeitos a adquirir uma infecção por HPV. (García-Espinosa, Moro-Rodríguez, & Álvarez-Fernández, 2013; Panatto et al., 2012)

A grande maioria das infecções são assintomáticas e subclínicas, sem nenhuma manifestação clínica ou morfológica; acabam por passar despercebidas, a não ser que se faça um teste molecular para detetar fragmentos do genoma nas células infetadas. Quase todas as infecções são transitórias, pois são controladas por uma resposta imune, só 10 a 20% das infecções se tornam crônicas e persistentes e são estas que têm um maior potencial oncogénico. (Katherine, Giraldo, Pontes, & Dantas, 2009; Medina, Medina, & Merino, n.d.) A grande maioria das infecções ocorre de forma autolimitada, sendo o vírus eliminado em aproximadamente dois anos, sem deixar sequelas e muitas vezes sem manifestação de qualquer sintoma. (Katherine et al., 2009; Panatto et al., 2012)

O HPV forma um grupo grande de vírus dos quais se identificaram mais de 100 tipos, e 40 destes são transmitidos sexualmente e afetam principalmente as células epiteliais da pele e da mucosa e geralmente formam umas capas basais. (Dutra et al., 2008) Em 2013 já se dizia que até à data se tinham identificado 120 tipos de HPVs diferentes e que cada tipo estava associado a uma infecção em locais anatómicos particulares. (Danielewski, Garland, McCloskey, Hillman, & Tabrizi, 2013) Assim alguns tipos de Papilomavírus humano infetam a mucosa oral, outros a mucosa laríngea, outros os genitais externos e outros a mucosa cervical. Os tipos de HPV associados a lesões orais são o HPV-1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35, 45, 52, 55, 57, 58, 59, 69, 72 e 73). (Castro & Bussoloti Filho, 2006) Os tipos de HPV 13 e 32 são exclusivos da cavidade oral. (Ronell, 2005)

Somando a todos os tipos de HPVs caracterizados, existe um grande número de tipos cuja sequência genética ainda não foi obtida pelos métodos convencionais. (Pereira, Porro, Francisco, & Tomimori, 2011)

Atualmente, os vírus são classificados em alto e baixo risco em função do seu potencial oncogénico. Por exemplo, os tipos de HPV 6, 11, 13, 32 têm um baixo potencial de progressão maligna. Em contraste, os tipos de HPV de alto risco oncogénico como o HPV 16, 18, 31, 33 e 35, estão associados à leucoplasia e ao carcinoma espinocelular. (Ronell, 2005)

### **Evolução no tempo da descoberta do Papilomavírus**

Desde a Grécia antiga que são descritas lesões papilomatosas e verrucosas. (Pereira et al., 2011) A sua natureza infecciosa foi logo reconhecida, mas antes do século IX, as verrugas genitais eram consideradas uma forma de sífilis ou gonorreia. (Knipe, 2013)

No início do século XX, iniciaram-se as pesquisas sobre o papiloma vírus. Em 1933 o papiloma vírus foi isolado como possível agente etiológico de verrugas em coelhos. Desde então que esta classe viral tem sido considerada como agente infeccioso natural, em diferentes mamíferos, inclusive o homem. (Pereira et al., 2011)

Rous em 1935, descreveu que as verrugas em coelhos apresentavam potencial para transformação maligna. (Pereira et al., 2011)

Em 1949, através da microscopia observaram-se as primeiras partículas de papiloma vírus em verrugas humanas. Um ano depois foi descoberto o potencial carcinogénico do HPV em pacientes com epidermodisplasia verruciforme. (Pereira et al., 2011)

Na década de 1970, houve um aumento exponencial do vírus. Nesta época, Zur Hausen propôs a hipótese de que o HPV participava na etiologia do cancro do colo útero. (Pereira et al., 2011)

No início de 1980, houve um rápido crescimento de pesquisas, os HPV's 16 e 18 foram identificados e correlacionado com o cancro cervical. Em 1987 foi realizado o primeiro estudo epidemiológico sobre HPV e o cancro cervical (Gráfico 1). (Franco et al., 2012; Pereira et al., 2011)

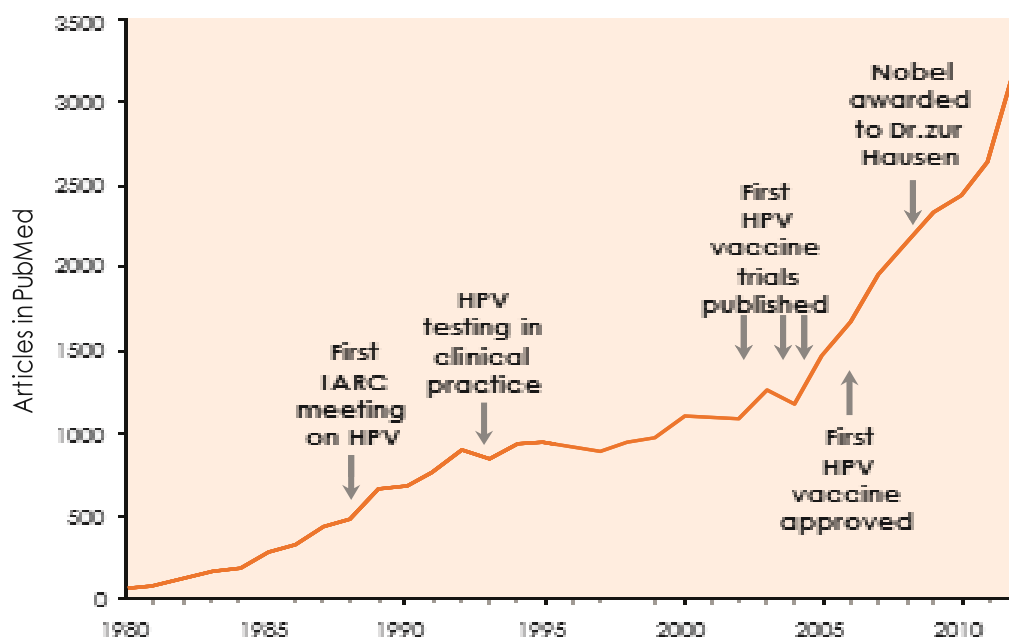


Gráfico 1: Número de pesquisas de artigos sobre Papilomavírus na base de dados *Pubmed Medline's* pelo ano de publicação. Os dados para 2012 é uma projeção para o ano inteiro com base no que foi contado até ao final de abril de 2012. IARC: International Agency for Research on Cancer. (Franco et al., 2012)

O gráfico 1 demonstra o crescimento explosivo no campo da pesquisa do HPV, impulsionado pelo progresso da nossa compreensão do papel deste vírus na doença e ainda mais acelerado com o advento das vacinas contra o HPV. (Franco et al., 2012)

No ano 2006, a primeira vacina contra o HPV foi aprovada tendo, desde então, havido muito progresso. (Franco et al., 2012)

Em 2008, o reconhecimento veio na forma de um Prémio Nobel de Fisiologia ou Medicina de Dr. Harald zur Hausen, o primeiro proponente do seu papel causal no cancro do colo do útero (gráfico 1), em cujo laboratório muitos dos tipos de HPV foram os primeiros a serem clonados e sequenciados. (Franco et al., 2012)

### 3. DESENVOLVIMENTO

#### 3.1. PAPILOMAVÍRUS HUMANO

##### 3.1.1. Características do vírus

Os Papilomavírus humanos pertencem a uma grande família de vírus, os *Papovaviridae* – Género *Papillomavirus*. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014; Pereira et al., 2011) Estes são pequenos, com 50 a 55nm de diâmetro (figura 2). (Pereira et al., 2011; Ronell, 2005) O vírus papiloma humano caracteriza-se por se epiteliotrópico, ou seja, tem afinidade por epitélios. (Fatahzadeh, Schlecht, & Chen, 2013; Grce & Mravak-Stipetić, 2014; Zonta, Monteiro, Santos Jr, & Pignatari, 2012) As superfícies epiteliais são aquelas cobertas por pele, mucosa, ou ambas, como a boca, faringe, língua, amígdalas, vagina, pénis e ânus. (Pereira et al., 2011; Ronell, 2005) Os vários tipos de HPV têm um tropismo muito estrito e infetam qualquer mucosa (*α-papillomaviruses*) ou pele (*β- e γ-papilloviruses*). (Grce & Mravak-Stipetić, 2014; Tachezy, Smahelova, Kaspirkova, & Salakova, 2013) Apresentam um genoma de aproximadamente 8.000 pares de base (8kb) de DNA dupla cadeia e circular. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014; Pereira et al., 2011) Apresentam um tamanho bastante pequeno, contudo apresentam uma biologia molecular muito complexa. O DNA encontra-se associado a proteínas semelhantes a histonas, envoltas por 72 capsómeros constituídos por duas proteínas estruturais, L1 e L2. Estes vírus são capazes de infetar tanto seres humanos como animais (gatos, coelhos e primatas não humanos), sendo o homem o hospedeiro mais extensivamente estudado até à data.(Pereira et al., 2011)

Existem mais de 150 génotipos de HPV, dos quais aproximadamente 40 tipos infetam a mucosa oral e anogenital, enquanto que os outros infetam pele. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014)

Os papilomavírus são muito específicos para cada espécie, não havendo relatos até à data de papilomavírus de uma espécie que causaram infeção produtiva noutra espécie. A sua replicação ocorre no núcleo das células escamosas epiteliais. (Pereira et al., 2011)

O genoma encontra-se dividido em três regiões: uma região longa de controlo (*long control region* (LCR)) NCR (*non-coding region*) ou URR (*upstream regulatory region*) e as regiões precoce (*early* (E)) e tardia (*late* (L)). As regiões E e L codificam proteínas virais e são denominadas ORFs (*open read frames* ou unidades de tradução), enquanto

LCR é uma região não-codificante (figura 1). (Pytynia, Dahlstrom, & Sturgis, 2014; Zonta et al., 2012) Na região E encontram-se até 8 genes (E1 até E8) que são responsáveis pela replicação do HPV (E1 e E2), transcrição do DNA (E2), maturação e libertação das partículas virais (E4), transformação celular (E5, E6, E7) e imortalização (E6 e E7). Estes dois últimos genes também codificam proteínas associadas à malignização de lesões. Tais proteínas estimulam a proliferação celular por interagir com os genes p53 e pRb, que são responsáveis, pelo controlo e correção do DNA celular, pela transformação celular e evolução maligna das lesões. Apenas as oncoproteínas E6/E7 de HPVs de alto risco oncogénico são capazes de imortalizar queratinócitos humanos primários, mas não as proteínas análogas de HPV de baixo risco oncogénico. Os genes da região L (L1 e L2) codificam respetivamente, as proteínas principal e secundária do capsídeo. A região tardia L1 ORF é a mais conservada entre HPVs. O seu produto, proteína L1, representa 80% das proteínas do capsídeo viral, constituindo a proteína mais abundante e de alta imonogenicidade. A proteína L2, com a L1, contribui para a incorporação do DNA viral dentro do vírion. (Pereira et al., 2011)

A região LCR encontra-se entre L1 e E6 e possui entre 500 a 1000 pares de bases. Por norma não é bem conservada entre os HPVs e está envolvida com expressão génica e com a replicação viral que ocorre no núcleo da célula do hospedeiro. (Pereira et al., 2011)

Evidências semelhantes sugerem que o genoma do Papilomavírus é estático e mudanças na sua aparência por mutação ou recombinação são eventos muito raros. Alterações mutacionais parecem acontecer em uma frequência semelhante à que ocorre no genoma do hospedeiro infetado. (Pereira et al., 2011)

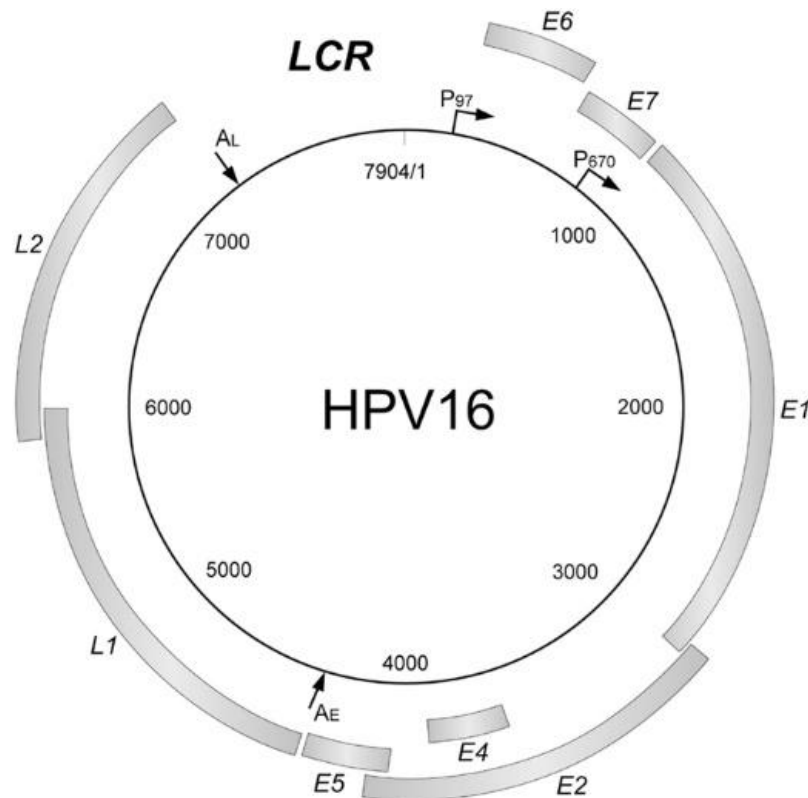


Figura 1: Mapa genômico do HPV 16

(Disponível em [http://www.frontiersin.org/files/Articles/20816/fmicb-03-00152-HTML/image\\_m/fmicb-03-00152-g001.jpg](http://www.frontiersin.org/files/Articles/20816/fmicb-03-00152-HTML/image_m/fmicb-03-00152-g001.jpg) 28/5/14 às 21.18h)

O ciclo de vida do Papilomavírus está diretamente relacionado com o programa de diferenciação celular da célula hospedeira. O vírus infecta as células basais do epitélio que apresentam potencial de diferenciação. As funções vegetativas virais, síntese de DNA e proteínas do capsídeo, bem como a montagem dos novos vírus, ocorrem exclusivamente nos queratinócitos diferenciados. Os papilomavírus permanecem longos períodos de vida no seu hospedeiro. Podendo ser encontrada uma grande variedade de tipos diferentes de Papilomavírus na pele normal em humanos e animais, o que reforça que o ciclo de vida latente é uma característica frequentemente presente nesses vírus. (Pereira et al., 2011)

Os tipos de HPV são classificados de acordo com o potencial oncogénico, ou seja tipos de HPV baixo risco ou alto risco carcinogénico. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014; Machado et al., 2010)

Os vírus de baixo risco oncogénico são os HPV1-4, 6, 7, 9-15, 17, 19, 20-29, 32, 34, 36-38, 40-44, 46-51, 53-55, 57, 59-63, 65, 71, 72, 74-78, 80, 81, 83, 84, 86-91, 94 e 95, que causam lesões benignas conhecidas como verrugas orais, papilomas e epitélio branco da cavidade oral. Os vírus de alto risco oncogénico são o HPV-5, 8, 12, 14, 16, 18-21, 24-26, 30, 31, 33-36, 39, 45, 47, 51-53, 56, 58, 59, 66, 68, 67, 73, 82, 85, 92, 93 e 96. Nas lesões de alto grau e cancro estão sobretudo implicados os vírus 16, 18, 45 e 56. (Barroso H., Silvestre M. A., Taveira N., 2014)

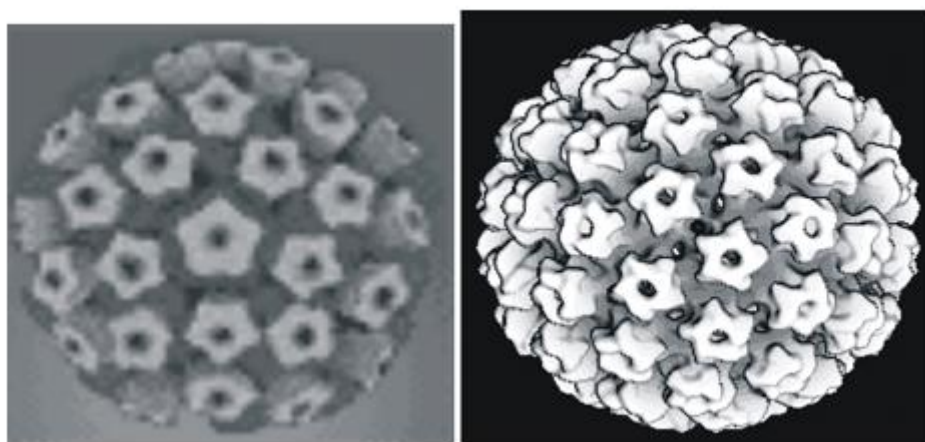


Figura 2: Estrutura tridimensional do papilomavírus humano

(Medina et al., n.d.)

Os fatores genéticos e imunológicos são importantes para o desenvolvimento da infeção por HPV, contudo o seu papel ainda não foi estabelecido com clareza. A carga viral é também um determinante importante das manifestações clínicas da infeção. (Medina et al., n.d.)

### **3.1.2. Fatores de risco para carcinogénese**

O tabaco e o álcool são fatores de risco principais. Contudo há uma fração de pacientes não fumadores e que não consomem bebidas alcoólicas, tendo sido proposto o HPV como indutor da carcinogénese. Isto acontece cada vez mais em idades mais jovens e com comportamentos sexuais de risco (com histórico de um número elevado de parceiros sexuais, praticantes de sexo oral e precoce início da atividade sexual). (Termine et al., 2012; Tota, Chevarie-Davis, Richardson, DeVries, & Franco, 2011)

### 3.1.3. Co-fatores

Co-fatores são aqueles elementos que aumentam a probabilidade de progressão da infecção até ao cancro. Como por exemplo o consumo de tabaco e álcool, que aumentam a penetração do vírus na mucosa, elevando a probabilidade de lesões malignas e pré-malignas. (Jensen, Schmiedel, & Frederiksen, 2012; Medina et al., n.d.)

Dada a magnitude do problema, decidiu-se expor os conhecimentos sobre HPV oral à população, de forma a transmitir a necessidade de identificar precocemente as manifestações orais da dita patologia e valorizar a importância do tratamento o mais precocemente possível. (Medina et al., n.d.)

### 3.1.4. Filogenética

Os Papilomavírus são referidos por sorotipos, diferentemente dos outros grupos virais. A sua classificação é feita de acordo com a espécie de origem e com o grau de relação dos genomas virais, mediante a comparação da sequência dos nucleotídeos do seu genoma viral. Estes são agrupados em diferentes géneros, e por sua vez, divididos em diferentes espécies contendo um ou mais genótipos. Cada genótipo é agrupado em subtipos e variantes de acordo com a similaridade da sequência na região L1. Os géneros diferentes são os que partilham menos de 60% de semelhanças na sequência de nucleotídeos do capsídeo principal da proteína L1 ORF. Diferentes espécies virais dentro do mesmo género dividem 60 a 70% de semelhanças. Considera-se um novo tipo de HPV quando o seu genoma apresenta variações superiores a 10% nos genes L1, E6 e E7 e quando se comparam com qualquer tipo de HPV previamente conhecido. Se for num caso em que não existem semelhanças entre 2 a 10%, representa um novo subtipo. Se for um caso de existirem variações menores que 2% representa variações de tipos.

*Alfapapilomavírus*, *Betapapilomavírus*, *Gamapapilomavírus*, *Mupapilomavírus* e *Nupapilomavírus* são os géneros pelos quais os HPVs são agrupados (Figura 3). Os restantes géneros agrupam os Papilomavírus isolados em mamíferos e pássaros. No agrupamento filogenético há normalmente similaridades biológicas e patológicas, contudo existem frequentemente divergências. Por exemplo, pode surgir um caso de

espécies diferentes pertencentes a um mesmo gênero, contudo exibirem características completamente diferentes.

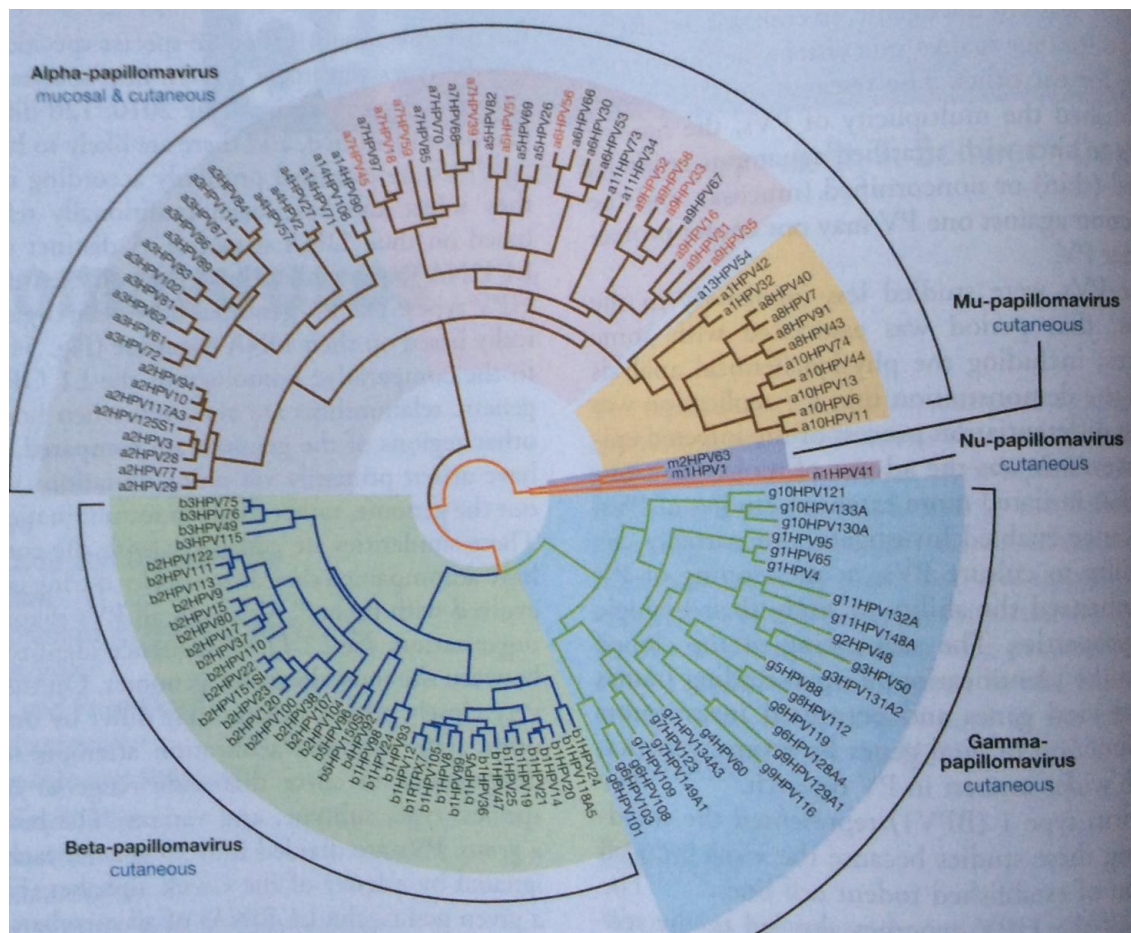


Figura 3: Árvore que demonstra os diferentes grupos existentes para os diferentes tipos de HPV

(Knipe, 2013)

### Alfapapilomavírus (supergrupo A)

Os alfapapilomavírus têm tropismo por mucosa, sendo encontrados essencialmente em lesões genitais. (Bottalico et al., 2011) Neste grupo encontram-se os HPV de alto risco para o cancro do colo do útero, como o HPV 16 e 18, alocados respetivamente, nas espécies 9 e 7 deste gênero, e os tipos de baixo risco, como os HPV 6 e 11, ambos na espécie 10. Paralelamente, neste mesmo gênero, encontram-se tipos de HPV não mucosos. Destacando-se o HPV 7, associado a verrugas cutâneas em açougueiros e

manipuladores de carne vermelhas, aves e peixe, os HPVs contidos na espécie 4 (HPVs 2, 27 e 57) e os da espécie 2 (HPVs 3 e 10), causadores de verrugas vulgares na pele. (Pereira et al., 2011)

*Betapapilomavírus (supergrupo B – subgrupo B1)*

Este grupo engloba cinco diferentes espécies. Os HPV 5 e 8, pertencentes à espécie 1 deste género, são os tipos mais frequentemente identificados na pele de indivíduos com epidermodisplasia verruciforme (EV). (Bottalico et al., 2011) Também encontramos neste género HPVs cutâneos detetados na pele da população geral sem lesões, demonstrando a ubiquidade e a elevada ocorrência de infeções assintomáticas. (Pereira et al., 2011)

*Gamapapilomavírus (supergrupo B – subgrupo B2)*

Este supergrupo abrange cinco espécies diversas com sete tipos diferentes que causam lesões cutâneas: HPVs 4, 48, 50, 60, 88 65, 95. (Pereira et al., 2011)

*Mupapilomavírus (supergrupo E)*

Este grupo contém os HPVs 1 e 63. O HPV 1 é o mais estudado e causa verrugas vulgares e palmares. (Pereira et al., 2011)

*Nupapilomavírus (supergrupo E)*

Neste grupo classifica-se apenas uma espécie, o HPV 41. (Pereira et al., 2011)

O tropismo tecidual de um grupo de vírus é um importante fenótipo biológico para compreender como os vírus evoluem em nichos ecológicos e induzir efeitos patogénicos nos seus hospedeiros. (Bottalico et al., 2011)

### **3.1.5. Epidemiologia**

#### **3.1.5.1. Prevalência**

A infeção por HPV é uma das infeções de transmissão sexual mais comum no mundo. (Daley et al., 2014; Medina et al., n.d.) O cancro do colo do útero representa a segunda maior causa de morte por neoplasia entre as mulheres, com uma estimativa de 493 mil novos casos por ano. A incidência é muito mais baixa nos países em desenvolvimento, com uma estimativa que ronda os 4%, como sucede, por exemplo, nos EUA, onde o carcinoma do colo do útero ocupa o sexto lugar de incidência de

tumores sólidos malignos mais comuns na mulher. No entanto, a prevalências nos países em desenvolvimento como África, Caraíbas Sul e este da Ásia. (Barroso H., *et al.*, 2014)

A prevalência da infecção de HPV nos homens é mais difícil de obter devido à dificuldade que existe para obter amostras adequadas para a detecção de DNA. Contudo as estimativas de infecção por HPV nos homens apresenta valores muito similares aos valores a que se chegou para as mulheres. A infecção dos homens ocorre como nas mulheres, no início das relações sexuais, em idades cada vez mais jovens e quase todos os homens são assintomáticos. (Medina et al., n.d.) Alguns estudos demonstraram haver elevada incidência do cancro do colo do útero em mulheres cujo parceiro era portador de carcinoma do pênis. (Barroso *et al.*, 2014)

A estimativa global da prevalência de infecção por HPV genital é de 12%. A prevalência entre mulheres com uma citologia normal varia entre 2% a 42% e depende da idade e população de risco. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014)

Estudos epidemiológicos terão demonstrado que existe um agente transmitido sexualmente do homem para a mulher, por isso pensa-se que o homem tem um papel importante na transmissão do HPV. A probabilidade de infecção no homem aumenta com a idade, tal como nas mulheres. Isto provavelmente explica-se pelo experiência sexual durante os anos decorridos e pela multiplicidade de parceiras sexuais. (Medina et al., n.d.) Na mulher a prevalência é maior em jovens com menos de 25 anos e diminui até chegar aos níveis mais baixos por volta dos 40 e 50 anos. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014) Existem outros autores que defendem que existe um segundo pico depois dos 50 anos, observando assim uma curva bimodal, muito comum em países latino-americanos. O primeiro pico representa a rápida aquisição da infecção após o começo da atividade sexual, dura cerca de 8-10 meses e em condições de imunidade habitual é eliminada na maioria dos casos; só persistem 10% das infecções aos 35 anos de idade. O segundo pico dá-se nas mulheres pós-menopáusicas, e surge devido à reativação de infecções latentes ou devido a uma nova infecção. (Medina et al., n.d.)

#### 3.1.5.2. Incidência

A aquisição da infecção é muito comum em jovens e adolescentes. Estima-se que 75% da população sexualmente ativa pode adquirir a infecção durante a vida. (Medina et al., n.d.)

As mulheres foram mais estudadas do que em homens, contudo a história natural da infecção é semelhante para todos. Geralmente estas infecções são transitórias, cerca de 60% a 70% das infecções novas desaparecem num período de tempo de 1 ano e 91% das lesões desaparece em 2 anos. Apenas uma pequena porção das infecções por HPV se torna persistente, normalmente estas envolvem tipos de HPV de alto risco, que demonstraram persistir mais que os tipos de HPV de baixo risco. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014)

### **3.1.6. Fatores de risco para a obtenção da infecção**

O fator de risco mais consistente e documentado para a infecção por HPV é o número de parceiros sexuais. Outros fatores de risco para a obtenção da infecção do HPV são o início muito precoce de relações sexuais e o consumo de tabaco. (Medina *et al.*, n.d.)

### **3.1.7. Influência Geográfica da distribuição de HPV**

É importante considerar a influência geográfica na distribuição do tipo de HPV. A OMS recomendou a realização de estudos para investigar e adquirir conhecimentos sobre a prevalência dos diferentes tipos de HPV, no trato anogenital, na pele e no trato aerodigestivo. Esta informação epidemiológica pode ser considerada como uma estratégia preventiva da infecção mediante a aplicação de vacinas profiláticas que vão sendo autorizadas. (Medina *et al.*, n.d.)

Nos países em desenvolvimento 20% dos câncros nas mulheres são devidos ao HPV. Enquanto 10% dos câncros da cavidade oral são produzidos por HPV. (Medina *et al.*, n.d.)

Na Argentina entre 1997 e 2000 morreram devido ao cancro oral em média 1,15 por 100.000 habitantes. A incidência estimada a partir dos dados de mortalidade com a aplicação em desenvolvimento pelo IARC está entre 2,67 e 2,95 novos casos por 100.000 habitantes por ano. (Medina *et al.*, n.d.)

## **3.2. FORMAS DE TRANSMISSÃO DO HPV**

As vias de transmissão do HPV são diversas, e estas podem ocorrer por via perinatal, por infecção transplacentária, por líquido amniótico, por sangue, por contacto sexual, por

autoinoculação, e alguns autores sugerem uma possível transmissão por saliva. (Medina *et al.*, n.d.; Ronell, 2005) Sendo possível a transmissão do vírus HPV através do contacto pele-pele, pele-mucosa, mucosa-mucosa. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014)

A transmissão do vírus ocorre quando existe contato com as superfícies epiteliais, permitindo a transferência do mesmo entre epitélios. (Ronell, 2005) Devido à semelhante histologia da mucosa oral e genital, não é surpreendente que os mesmos tipos de HPV tenham afinidade por tecidos morfológicos semelhantes. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014)

A infecção virica pode ser adquirida em idades bastante jovens; já se demonstrou a presença do vírus HPV em 6% da população infantil, 13% em adolescentes e 23% em adultos. (Ronell, 2005)

O HPV é altamente transmissível, por via sexual, em ambos os sexos. Estudos epidemiológicos têm consistentemente relatado marcadores de atividade sexual, incluindo o número de parceiros sexuais ao longo da vida e idade de início da vida sexual, pois estes são os fatores de risco mais importantes para a infecção por HPV. Embora a idade de iniciação sexual é seja muitas vezes fortemente associada com outros comportamentos sexuais, esta também pode ser um verdadeiro fator de risco causal para a infecção pelo HPV devido à grande ectopia cervical durante a adolescência. (Tota *et al.*, 2011) A infecção por HPV é considerada a Doença Sexualmente Transmissível (DST) de origem viral mais incidente na população mundial, o que representa um grave problema de saúde pública. (Vargas & Suzuki, 2010; Pytynia, Dahlstrom, & Sturgis, 2014; Pytynia *et al.*, 2014; Dutra *et al.*, 2008; Daley *et al.*, 2014; Tota *et al.*, 2011; Grce & Mravak-Stipetić, 2014) Além das relações sexuais peno-vaginais, o HPV também é transmitido por outras práticas sexuais, incluindo relações sexuais peno -anal, sexo oral e sexo digital-vaginal. Há evidência de que a transmissibilidade pode variar de acordo com o genótipo de HPV. Os tipos de HPV de alto risco são mais fortemente associados com o comportamento sexual do que os tipos de HPV de baixo risco. A infecção por HPV também pode ser transmitida durante o parto do colo do útero de mães infectadas para a mucosa orofaríngea de seus filhos, com maior probabilidade de transmissão no parto vaginal em comparação com a cesariana. (Tota *et al.*, 2011)

Independente de marcadores de atividade sexual, outros fatores relacionados com a infecção por HPV ou com a persistência incluem a tenra idade, o nível socioeconómico, a

multiparidade, a circuncisão, o uso do preservativo, o uso de contraceptivos orais, o tabagismo, a nutrição, a imunossupressão, a carga viral, bem como determinados polimorfismos genéticos no sistema antígeno leucocitário humano. A presença de infecção por HPV pré-existente também está associada ao aumento do risco de contrair a infecção com outros tipos de HPV. No que diz respeito a preservativos, um efeito paradoxal por vezes tem sido relatado de forma que o uso do preservativo parece aumentar o risco de infecção por HPV, provavelmente resultado de uma maior probabilidade de infecção de parceiros com os quais os preservativos são usados e maior probabilidade de transmissão por única relação sexual. No entanto, quando usado de forma consistente entre os parceiros das mulheres recentemente sexualmente ativas, dados atuais sugerem que o preservativo pode reduzir (mas não eliminar) o risco de transmissão do HPV genital macho-fêmea. Há também evidências de que a circuncisão masculina reduz o risco de infecção pelo HPV entre os homens, que por sua vez reduz o risco de transmissão e infecção subsequente em seus parceiros. (Tota *et al.*, 2011)

Nos últimos anos, a incidência de HPV oral e cânceros relacionados aumentou nos Estados Unidos. (Tota *et al.*, 2011) Na cavidade oral o papiloma oral é uma das lesões epiteliais mais frequentes e é provocada pela infecção por HPV. Este vírus transmite-se por contacto direto e a maioria das lesões da cavidade oral devem-se a contacto direto por auto-inoculação, por relações orogenitais (Medina *et al.*, n.d.) e por beijar a boca aberta. (Tota *et al.*, 2011). É comum supor que este aumento da doença está relacionada a um aumento de comportamentos sexuais orais (por exemplo, aumento do número de parceiros sexuais orais durante a vida) entre os adolescentes. Infelizmente, os dados sobre estes tipos de comportamentos sexuais estão indisponíveis, o que faz com que seja difícil verificar empiricamente esta tendência temporal. (Tota *et al.*, 2011)

Apesar disso, a saliva tem demonstrado ter um papel protetor das infecções através da existência de um grande número de agentes anti-microbianos orais tais como: lisozima, lactoferrina, IgA e citocinas. Os tecidos altamente queratinizados que caracterizam a cavidade oral podem promover uma barreira contra a infecção por HPV, fazendo com que seja menos provável que o vírus invada e alcance as células das capas basais ao contrário da mucosa cervical. No entanto, há alguns estudos com falta de evidência de associação entre os tipos de HPV no colo do útero e na cavidade oral, assim como permanecem desconhecidas as vias de transmissão e infectividade do vírus; outros

demonstraram uma pequena concordância de infecção nestes dois locais em parceiros sexuais. (Medina *et al.*, n.d.)

### 3.2.1. Replicação do vírus HPV

Os vírus não são organismos independentes. Ao contrário das bactérias, quando um vírus está sozinho não é metabolicamente ativo, uma vez que precisa de uma célula hospedeira para funcionar e se replicar. (Ronell, 2005)

O ciclo de vida do papilomavírus difere de todas as outras famílias virais porque se desenvolve de forma coordenada com a diferenciação e a divisão celulares. A infecção requer o acesso do vírus às células das camadas basais do epitélio da epiderme e da mucosa, o que pode ser facilitado pela existência de microlesões no epitélio. O ciclo começa com a ligação do papilomavírus aos recetores celulares da célula basal do epitélio seguindo-se a endocitose e sua entrada no citoplasma celular (figura 4).

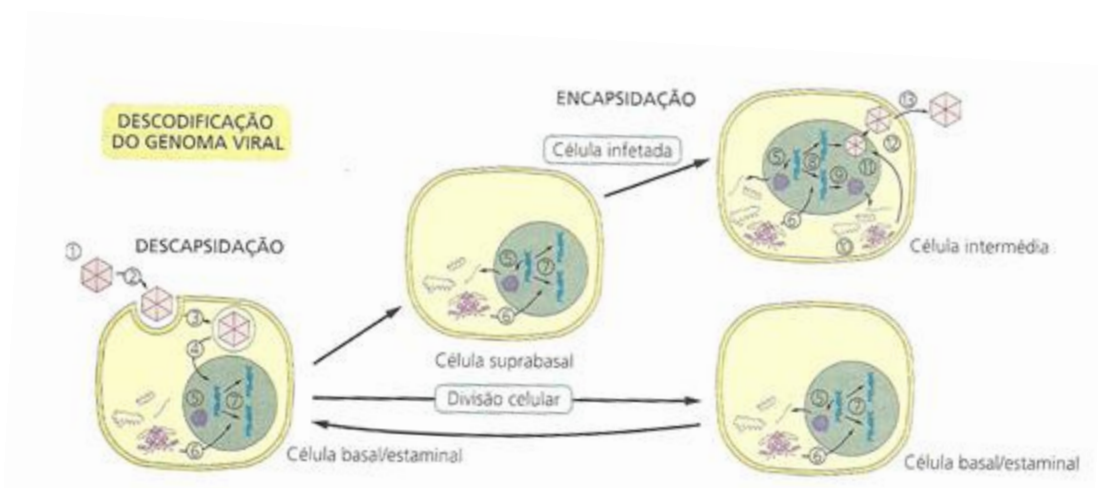


Figura 4: Ciclo replicativo do HPV

O ciclo começa pela infecção de uma célula basal do epitélio: (1) ligação aos recetores celulares; (2) e (3) entrada do vírus na célula por endocitose; (4) transporte para o núcleo, descapsidação e liberação do ADN viral; (5) transcrição dos genes precoces (E); (6) síntese de proteínas precoces; (7) replicação de ADN viral. Esta primeira fase acontece nas células bases/estaminais e também nas células suprabasais do epitélio. As fases seguintes dão-se nos queratinócitos diferenciados; (8) replicação do ADN viral; (9) transcrição dos genes tardios (L); (10) produção das proteínas da cápside (L1 e L2); (11) encapsidação do vírus; (12) rutura do núcleo e (13) libertação do vírus. (Barroso *et al.*, 2014)

Possíveis recetores virais são a integrina  $\alpha 6 \beta 4$  e o sindecan-1, moléculas presentes nas células basais do epitélio e que são expressas em maior quantidade quando ocorrem microlesões. O vírus passa do citoplasma para o núcleo onde ocorre a descapsidação e libertação do ADN. (Barroso *et al.*, 2014)

Nas células basais do epitélio a expressão dos genes virais é reprimida. A expressão dos genes precoces e tardios só acontece ao nível dos queratinócitos ou das camadas superiores das mucosas. A replicação viral associa-se a uma proliferação celular excessiva de todas as camadas epidérmicas exceto da camada basal. Este processo produz acantose, paraqueratose e hiperqueratose (figura 5).

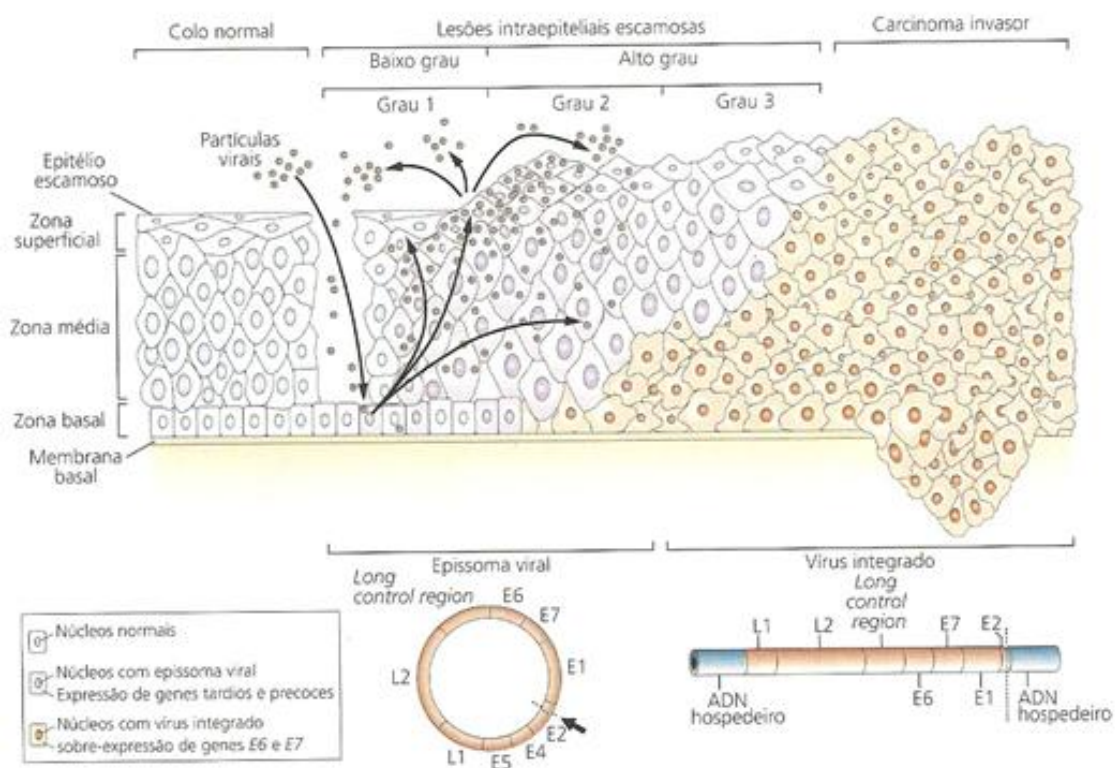


Figura 5: Expressão fenotípica da infecção po HPV

A patogénese do HPV está associada à integração do ADN viral no cromossoma celular. LCR – *long control region*. (Barroso *et al.*, 2014)

A proliferação celular corresponde à primeira resposta à infeção pelo HPV. Dado que as células basais do epitélio pavimentoso estratificado (epidermoide) são as únicas capazes de se dividir, são elas o alvo inicial de infeção pelo HPV. A infeção pelo HPV pode originar lesões benignas e/ou malignas. Nas lesões benignas, o ADN do HPV não se integra nos cromossomas e o vírus pode manter-se numa situação de latência em que não há transcrição completa do seu genoma. A diferenciação celular pode, contudo,

induzir a expressão de genes virais. No caso das variantes oncogénicas de HPV, o genoma viral integra-se no ADN cromossómico da célula e a sua expressão vai permitir o controlo do ciclo celular, o que está na génese da displasia celular (ligeira a grave) e da sua evolução para a neoplasia. (Barroso *et al*, 2014)

### **3.2.2. Patogénese e Imunidade do vírus HPV**

Uma vez alcançada a camada basal dos queratinócitos, o vírus, como vimos anteriormente, pode permanecer na forma episómica em latência ou abandonar este estado e aproveitar-se da diferenciação celular para se replicar. Cada HPV tem, na sua diversidade, a possibilidade de infetar as células de forma ativa, persistir de forma latente e iniciar a doença. Durante a infeção os vírus podem ser eliminados do hospedeiro por ação do sistema imunológico. Alguns vírus podem persistir numa forma latente depois da infeção aguda resolvida e podem reativar mais tarde a infeção. Outros, vírus, porém, podem persistir com baixa infecciosidade, sobreviver a uma fraca resposta imunológica e produzir a doença mais tarde. Em geral, estas infeções tornam-se crónicas e as lesões podem persistir e manter-se por meses ou anos. (Barroso *et al*, 2014)

O HPV não tem atividade citolítica e, portanto, a sua infeção não é acompanhada de inflamação. Por outro lado, as células apresentadoras de antigénio (APC) fundamentais para a resposta imunológica, são depletadas no epitélio infetado. As células filhas das células estaminais epiteliais dividem-se ao longo da membrana basal e de seguida maturam-se verticalmente através do epitélio sem mais divisões (lado direito do esquema da figura 6). O HPV acede ao epitélio do colo uterino através de microabrasões (lado esquerdo do esquema da figura 6). O vírus infecta as células estaminais da camada basal do epitélio e vai ocorrer expressão de proteínas virais precoces não estruturais (E1, E2, E6, e E7). Sob regulação destas proteínas, a população de células em divisão expande-se verticalmente mas a diferenciação epitelial atrasa-se e não se completa. As restantes proteínas virais são expressas sequencialmente e os virões maduros são produzidos nas camadas mais superficiais do epitélio.

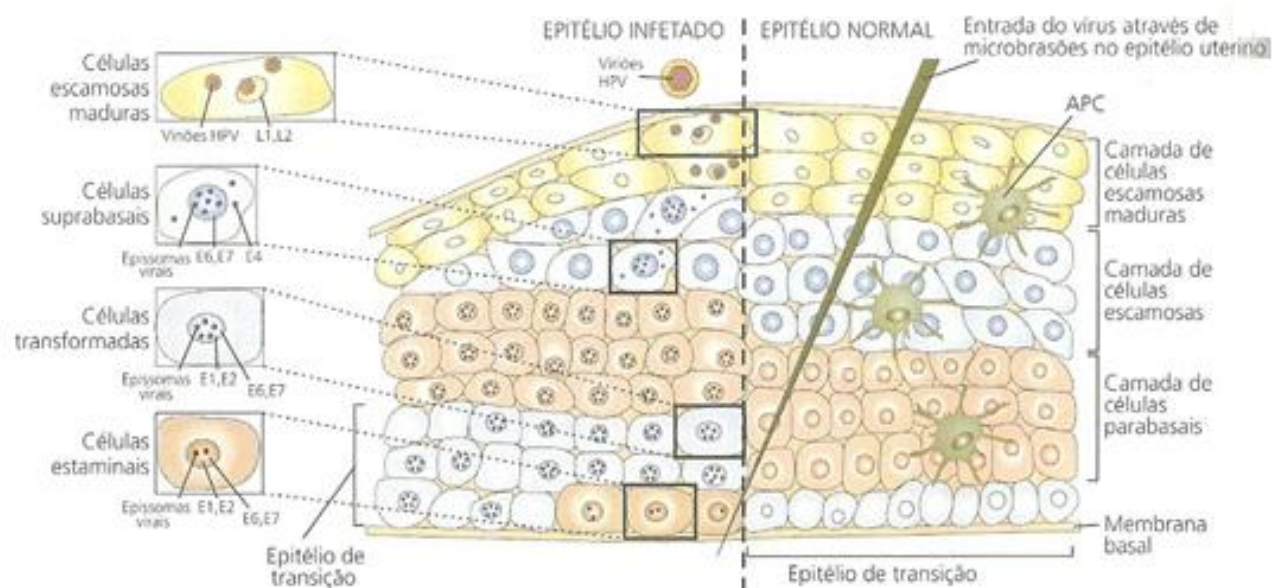


Figura 6: Localização dos principais estádios do ciclo de vida do HPV no epitélio pavimentoso (escamoso)

Arquitetura da célula epitelial pavimentosa e a expressão das proteínas do HPV, após a infecção. (Barroso *et al.*, 2014)

Estes dois fenómenos podem explicar a inexistência de uma resposta imunológica celular eficaz contra este vírus. Por outro lado, a infecção por HPV induz a produção e baixos níveis de anticorpos no soro e nas mucosas, anticorpos estes que em geral não têm capacidade neutralizante e não exercem qualquer tipo de contacto sobre a replicação viral.

A genética do hospedeiro, nomeadamente ao nível dos genes do complexo *major* de histocompatibilidade (MHC) da classe II, parece influenciar o desenvolvimento e progressão do cancro do colo do útero. No futuro, a genotipagem de alguns *loci* polimórficos de genes envolvidos na resposta imunológica (por exemplo, genes do MHC e genes que codificam para TNF-, interleucina-4 e proteína do macrófago associada à resistência à imunidade natural 1 – NRAMP1 e do gene p53 pode vir a ser útil para identificar a suscetibilidade individual para o cancro causado pelo HPV. (Barroso *et al.*, 2014)

### 3.3. MÉTODOS PARA DETECÇÃO DO HPV

O esclarecimento sobre os riscos associados com a infecção oral por HPV é dificultada pela falta de um “gold-standart” para a deteção de HPV oral. A deteção precoce de

lesões associadas ao HPV na mucosa oral é essencial na prevenção de cancro oral, para que haja um consenso sobre a necessidade de desenvolver um teste de laboratório sensível válido para detetar o HPV. Muitas pesquisas seriam necessárias para determinar o uso do teste de HPV no que diz respeito à prevenção, tratamento e monitorização da recorrência das lesões orais. Existe a possibilidade de encontrar material genético do HPV na mucosa normal ou danificada, quer em lesões benignas ou malignas. (Medina *et al.*, n.d.)

### **3.3.1. Métodos para a obtenção de amostras**

O diagnóstico do Papilomavírus humano na mucosa oral pode ser suspeitado através do exame clínico da lesão, citologia e biopsia. (Castro & Bussoloti Filho, 2006) Na mucosa saudável e em relação ao método de estudo utilizado, é possível encontrar-se HPV em 13-40 % das amostras, com material obtido por biópsia, citologia esfoliativa (escova (figura 7), zaragatoa ou espátula) ou por enxague oral. (Medina M. L. *et al*, 2009)

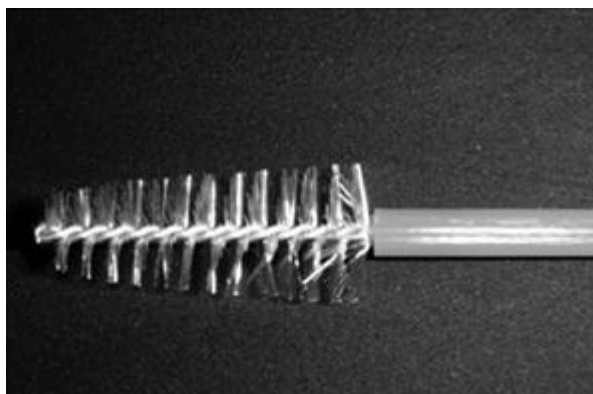


Figura 7: Exemplo de escova para obter amostras esfoliativas

(Venancio *et al.*, 2012)

No método de escovagem (Brushing) as amostras de células da mucosa oral são obtidas por escovagem (por exemplo a escova Cytobrush®, Thin prep®, Rovers® Orcellex® (figura 8)) a partir do local da lesão. Apresenta-se como um método muito menos invasivo que a biópsia e mais fácil de realizar. (N. Termine *et al.*, 2012)



Figura 8: Exemplificação do modo de utilização do Rovers® Orcellex® no bordo lateral da língua, na mucosa jugal, na gengiva e no pavimento da boca).

(“Rovers Medical Devices,” n.d.)

Na biopsia, após anestesia local, realiza-se uma incisão com um bisturi tradicional (figura 9). As amostras são obtidas de cada paciente a partir de uma área não-necrótica do tumor. (N. Termine *et al.*, 2012).



Figura 9: Exemplo de biopsia.

(“Estomatologia Online,” 2012)

A biopsia permite obter uma amostra mais representativa da mucosa oral comparando com a amostra esfoliativa (Brushing). Por outro lado a citologia exfoliativa é menos invasiva que a biopsia e permite obter uma colheita de células de uma superfície maior com um risco menor de contaminação de DNA do que num procedimento cirúrgico. (N. Termine *et al.*, 2012).

As biopsias têm como principal limitação o fato de não fornecer informações sobre o genótipo do vírus infetante, bem como não permitir tempos de detecção de vírus, porque as células parecem normais. (Medina M. L. *et al.*, 2009)

O método brushing parece ser um método sensível para detetar todos os tipos de HPV na cavidade oral, enquanto a biopsia é um método muito preciso para detetar HPV de alto risco em lesões malignas. (N. Termine *et al.*, 2012).

O método de enxague oral (*mouthwash*) foi proposto como um método mais eficiente para obter amostras etiológicas do que o método brushing da mucosa oral, tanto em termos de quantidade de DNA, como de qualidade e estabilidade, sendo aceite com muita facilidade pelo paciente.

A falta de concordância entre a biopsia e a citologia exfoliativa já existe desde há muito tempo. A associação do HPV com o carcinoma espinocelular foi significativa só quando o HPV foi detetado nas amostras de biopsia, pois a associação foi totalmente perdida quando foram apenas utilizadas células exfoliativas para a deteção de HPV. Isto foi demonstrado também no trato genital. Assim conclui-se que para obter resultados mais precisos, apenas os tecidos biopsados deveriam ser utilizados para a deteção de HPV. (N. Termine *et al.*, 2012).

O HPV não cresce em meio de cultura convencional e os métodos de diagnóstico sorológico apresentam uma precisão limitada. O diagnóstico da infeção do HPV pode ser feito por histopatologia das lesões ou deteção do DNA viral nas células infetadas. (Castro & Bussoloti Filho, 2006)

O aspeto citológico da infeção do HPV caracteriza-se por:

1. Critérios maiores: coilócitos clássicos, halos citoplasmáticos perinucleares e displasia nuclear.
2. Critérios menores: disceratócitos, metaplasia imatura atípica, macrócitos e binucleação. Este método tem sensibilidade limitada e não tipa o HPV.

(Castro & Bussoloti Filho, 2006)

No entanto, os critérios da análise histológica são limitados. Ou seja, não são patognomónicos da infeção por HPV.

### 3.3.2. Testes para a detecção de DNA ou RNA de HPV

Os métodos usados na detecção do DNA do HPV nas lesões variam amplamente na sua sensibilidade e especificidade. Estes são divididos em três categorias: os de baixa sensibilidade, moderada sensibilidade e alta sensibilidade. Os primeiros são a imunohistoquímica e a hibridização *in situ*. Estes só detetarem os vírus quando presentes em mais de 10 cópias do DNA viral por célula. Os de moderada sensibilidade, que compreendem a hibridização *Southern blot*, *dot blot* e a hibridização dot reversa, por só detetarem os vírus quando há 1 a 10 cópias do DNA viral por célula. E por fim os de alta sensibilidade, a reação de polimerização em cadeia (PCR), por detetar o vírus em menos 1 cópia do DNA viral por célula. Ou seja cada método é limitado pela sua sensibilidade e especificidade e na prática, pelo custo e pela disponibilidade comercial. (Castro & Bussoloti Filho, 2006)

Os métodos imunológicos demonstram a presença de anti-corpos para o HPV. Esta determinação tem uma limitada sensibilidade que produz resultados difíceis de interpretação e, geralmente, não permite diferenciar os diferentes genótipos que causam infeção. A sua utilização está dirigida principalmente aos estudos epidemiológicos e de prevalência e não é recomendado para o diagnóstico da doença. (Medina M. L. *et al*, 2009)

A hibridação de DNA é uma técnica que permite determinar a presença do vírus e, mais especificamente, o seu DNA. (Medina M. L. *et al*, 2009). Os testes de hibridização são a escolha para a detecção do DNA ou RNA do HPV em esfregaços ou amostras de tecidos. São realizados diretamente ou após a amplificação do DNA e RNA pela reação de polimerização em cadeia. O princípio básico para todas estas técnicas de hibridização é a formação de dupla cadeia entre a cadeia única de DNA ou moléculas de RNA ou dupla cadeia de DNA desnaturado derivado de tipos de HPV clonados e a molécula de ácido nucleico viral presente na célula, que representa o alvo do teste de hibridização. (Castro & Bussoloti Filho, 2006)

A Hibridização *in situ* é realizada com dois tipos de sondas múltiplas (uma contém genótipos de baixo risco e outra genótipos de alto risco), tem uma sensibilidade limitada e não permite averiguar o genótipo exato, levando a problemas do tipo epidemiológicos e sociais. (Medina M. L. *et al*, 2009).

Dentre as técnicas de hibridização utilizadas destacam-se:

1. *Southern blot*, esta técnica possibilita estimar a quantidade de DNA na lesão. (Castro & Bussoloti Filho, 2006) Pode detetar de 1 a 10 cópias de DNA viral por célula. (Medina et al., n.d.) Apresenta uma moderada especificidade e sensibilidade, sendo considerado um instrumento valioso de pesquisa, contudo não tem aplicação na rotina clínica por ser demorado e trabalhoso. Apresenta também limitações em relação à grande diversidade de tipos de HPV, pois não é capaz de detetar o DNA de sequências virais desconhecidas. (Castro & Bussoloti Filho, 2006) Na reação *Southern blotting* o DNA viral é digerido por enzimas de restrição e os fragmentos são submetidos a uma electroforese em gel de policrilamida, transferidos por uma membrana de nitrocelulose e hibridizados com sondas marcadas com radioisótopos contra todo o genoma ou apenas uma região (figura 10). (Santos *et al.*, 2008)

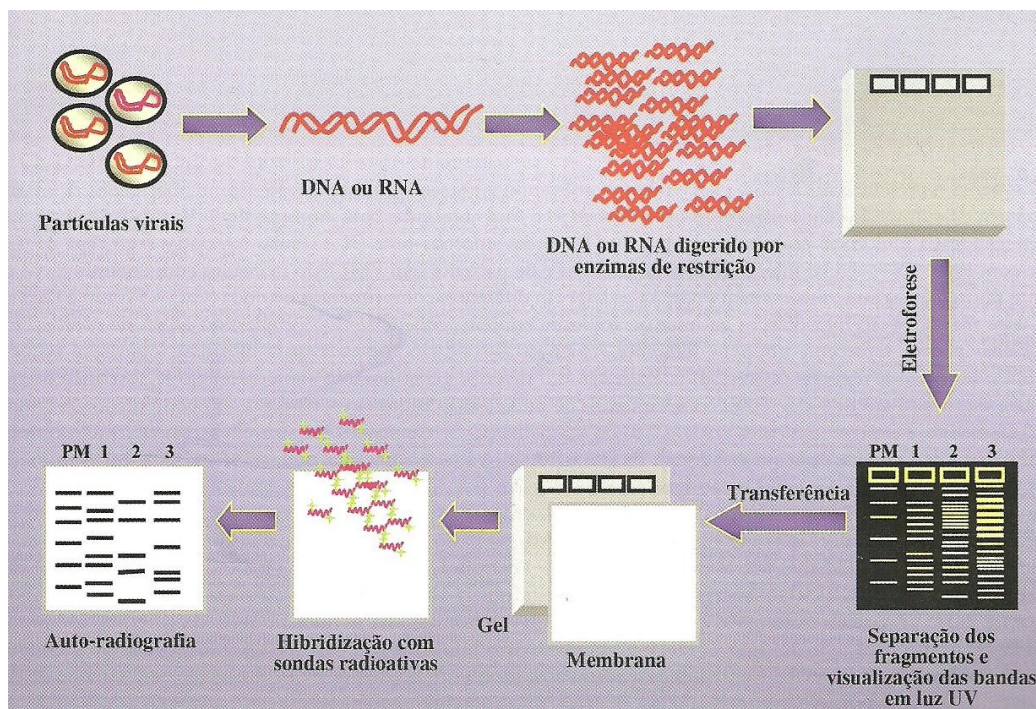


Figura 10: Esquema dos testes de Southern blotting. (Santos et al., 2014)

2. O *dot blot* e a hibridização dot reversa são técnicas trabalhosas, que apresentam sensibilidade similar e boa exatidão. (Pereira *et al.*, 2011) Na técnica *Dot blotting*, a sequência alvo é separada por electroforese, transferida para uma membrana e hibridizada com uma sonda marcada com radioisótopo ou enzima (figura 11). (Santos, Romanos & Wigg, 2008)

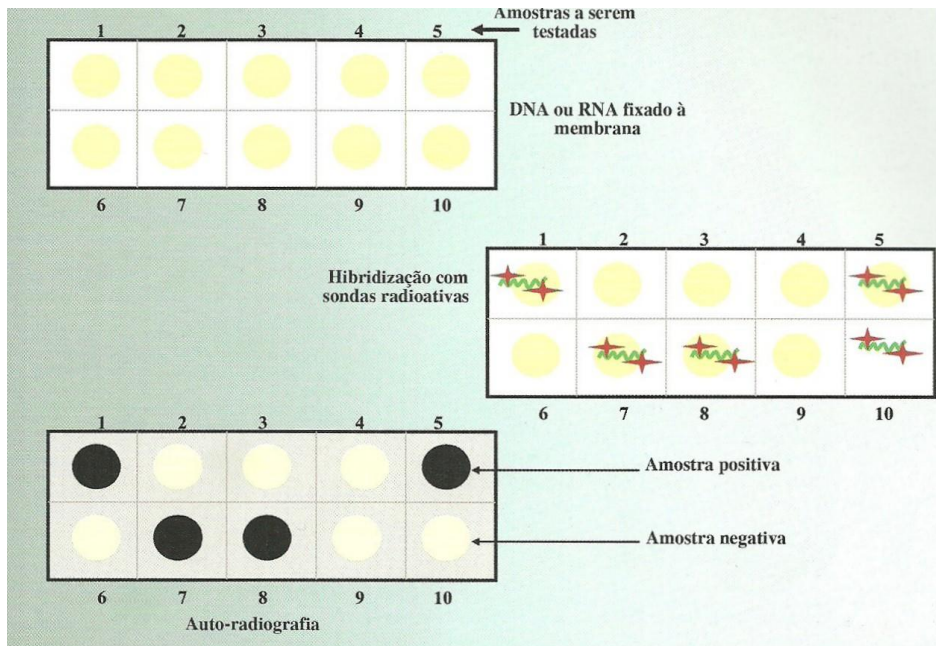


Figura 11: Esquema de teste de Dot blotting (Santos et al., 2014)

3. A hibridização *in situ* utiliza sondas radiomarcadas e permite a localização topográfica do DNA viral nas células e tecidos. Neste método as células ou fragmentos de tecidos são fixados em lâminas e submetidos, mais frequentemente, a um aquecimento para promover a desnaturação do ácido nucleico alvo, causando a separação das cadeias. A seguir a sonda é adicionada, e então é hibridizada à sequência complementar. A reação é lavada para remover as sondas que não se hibridizam, e, no caso de a sonda estar marcada com uma enzima, o substrato é adicionado. Após a adição do substrato, o esfregaço é examinado ao microscópio óptico para determinar se houve ou não hibridização (figura 12). (Santos *et al.*, 2008)

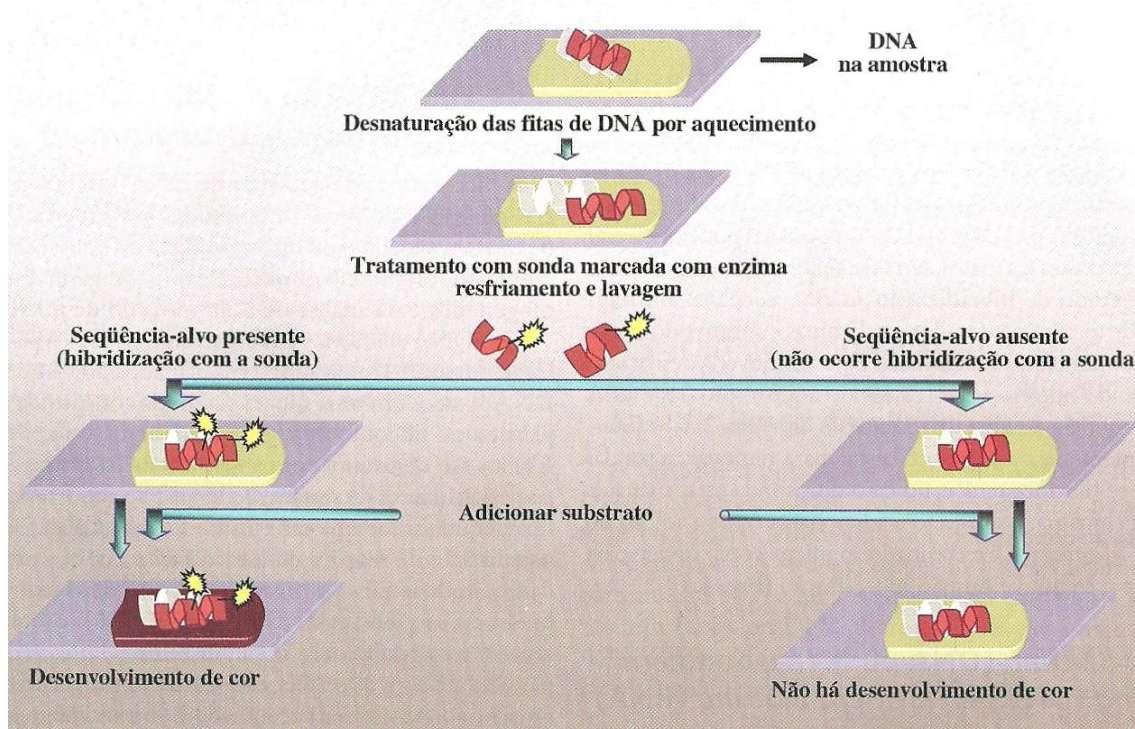


Figura 12 Esquema da reação de hibridização in situ (Santos et al., 2014)

Embora a sensibilidade desta técnica seja limitada, é o melhor método para avaliar a distribuição do HPV nas lesões e possibilita a localização viral com outros marcadores. (Pereira *et al.*, 2011)

4. Captura híbrida não radioactiva é uma técnica segura, de fácil realização e reprodutibilidade, bem como precisa para lesões mucosas. (Pereira *et al.*, 2011)

A reacção de polimerização em cadeia (PCR – Polimerase Chain Reaction) é uma técnica que revolucionou a virologia, devido à sua sensibilidade extremamente alta. Caracteriza-se pela amplificação de quantidades íminutas da sequência de DNA-alvo em diversos milhões de vezes. É um processo térmico cíclico que inclui três etapas, que são: a desnaturação (onde a cadeia dupla de DNA é separada em cadeias simples); anelamento (onde os iniciadores anelam especificamente com as sequências complementares de DNA-alvo cadeia simples); extensão do iniciador (onde a DNA polimerase termoestável gera cadeias “filhas” de DNA que atravessam a região entre dois iniciadores. A partir de então as duplas cadeias recém geradas servem como modelos para um ciclo de PCR subsequente. Os iniciadores (primeres) podem ser: os iniciadores específicos do tipo, que detetam um tipo simples de HPV, ou os iniciadores consensus (também chamados gerais ou genéricos) que detetam um painel de diferentes tipos de HPV numa única reacção (figura 13). (Castro & Bussoloti Filho, 2006)

Os iniciadores consensos utilizados na PCR para a detecção do HPV são geralmente o MY09-MY ou o GP5/GP6. Atualmente a PCR permite uma avaliação profunda dos dados epidemiológicos, incluindo a prevalência de infecções subclínicas ou latente. Entretanto ela tem as seguintes desvantagens: amplificação de quantidades minúsculas de DNA de HPV contaminantes, que podem levar a falsos resultados positivos. (Castro & Bussoloti Filho, 2006)

O resultado da PCR é visualizado como uma banda de peso molecular específico para o fragmento de DNA amplificado através de electroforese em gel de agarose ou poliacrilamida, mediante coloração com Brometo de Etílio. Após a amplificação do DNA viral pela técnica do PCR, o material precisa de ser submetido a uma técnica que permita a identificação o tipo de HPV. As técnicas mais frequentemente utilizadas com esse intuito são: *Southern blot*, *dot blot*, hibridização reversa, restrição enzimática e sequenciamento. (Pereira *et al.*, 2011)

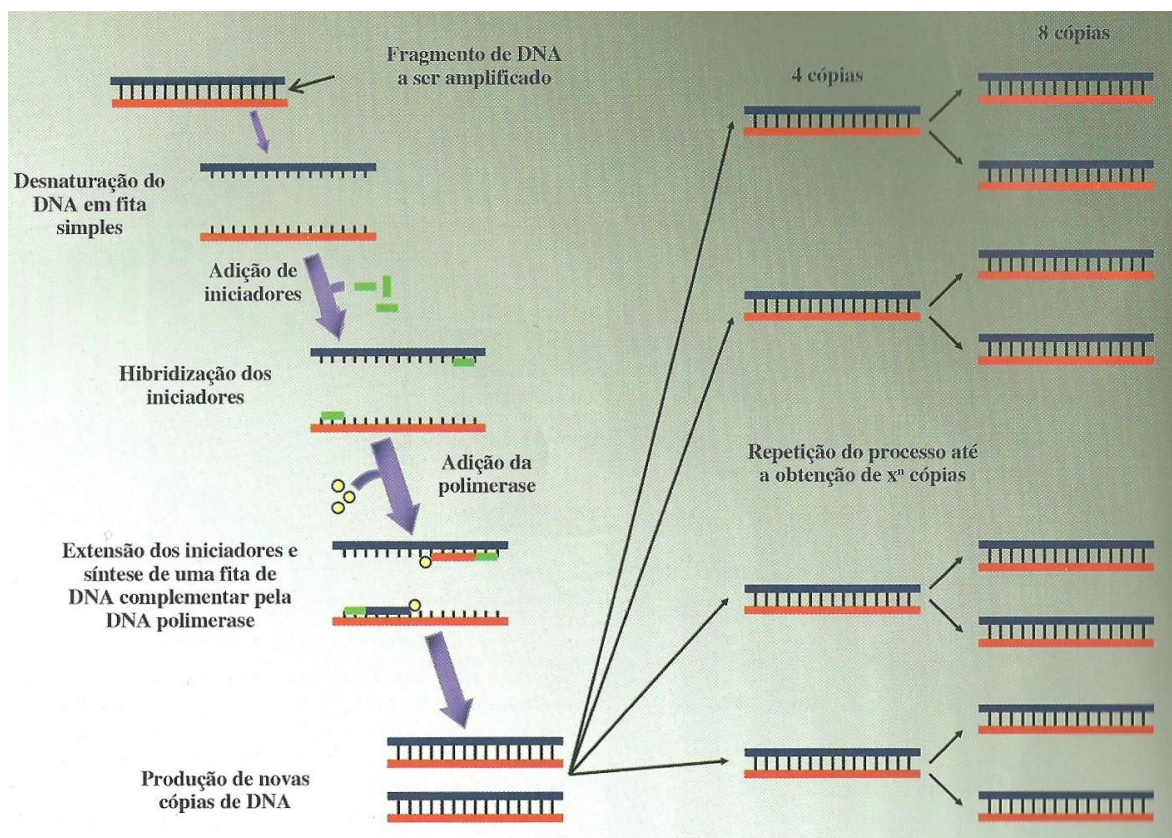


Figura 13: Esquema da reação em cadeia da polimerase (PCR). (Santos *et al.*, 2014)

### 3.3.3. Teste Cobas® (pesquisa de DNA de alto risco)

A *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o teste Cobas® como o primeiro teste de DNA para o vírus HPV para mulheres com 25 anos ou mais, que pode ser usado sozinho para ajudar um profissional de saúde a avaliar a necessidade de uma mulher realizar testes adicionais de diagnóstico para o cancro cervical. O teste também pode fornecer informações sobre o risco do paciente de desenvolver cancro do colo do útero no futuro. Usando uma amostra de células do colo do útero, o teste detecta DNA a partir de 14 tipos de HPV de alto risco. O teste identifica especificamente o HPV 16 e HPV 18 e, simultaneamente, detecta outros 12 tipos de HPV de alto risco. (“FDA,” 2014)

Com base nos resultados deste teste, as mulheres que obtiveram um resultado positivo para o HPV 16 ou HPV 18 devem submeter-se a uma colposcopia, um exame no qual se utiliza um instrumento (coloscópio) que ilumina e amplia o colo do útero para que um médico possa observar diretamente as células do colo do útero (figura 14). Mulheres que obtenham um resultado positivo para um ou mais dos outros 12 tipos de HPV de alto risco devem submeter-se a um teste de Papanicolau para determinar a necessidade de uma colposcopia. Os profissionais de saúde devem usar os resultados do teste cobas® HPV juntamente com outras informações, como a história de triagem do paciente, fatores de risco e diretrizes profissionais atuais. (“FDA,” 2014)

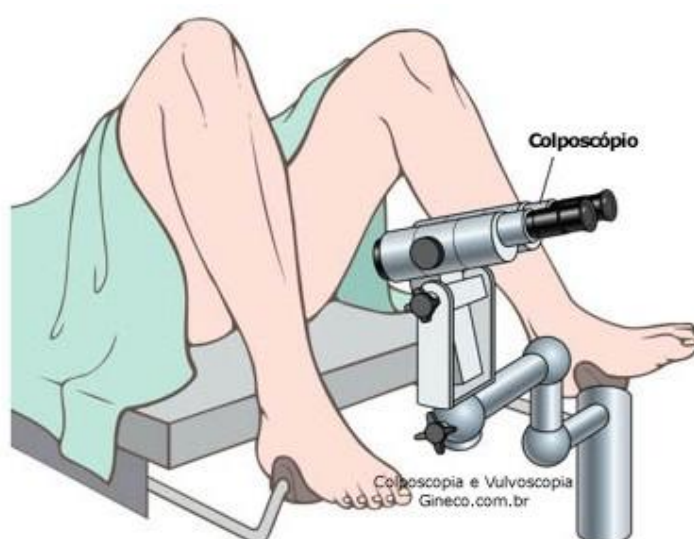


Figura 14: Imagem do instrumento Coloscópio. (“Toque ginecológico,” 2011)

### 3.3.4. Teste Clart STI® (genotipagem completa de DNA de HPV)

Clart®STIs são produtos para efeitos de diagnóstico *in Vitro* usado para a detecção e tipagem de bactérias, fungos e parasitas causadores de infecções do trato urogenital. A detecção é realizada simultaneamente pelo PCR multiplex e a subsequente visualização com a tecnologia Clart®, baseada em microarrays de baixa densidade. Este teste detecta material genético extraído da urina ou esfregaços (vaginais, cervicais, endocervicais, uretral, anal, faríngeo).

Apresenta também uma alta sensibilidade e especificidade, devido à presença de 120 sondas de hibridização para 18 alvos. Conseguindo resultados em 5h. (“Genômica,” n.d.)

## 3.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFEÇÃO POR HPV

### 3.4.1.1. Lesões Cutâneas Benignas

#### 1. Verrugas Cutâneas

As verrugas são as manifestações clínicas mais comuns e características da infecção pelo HPV. São tumores induzidos por vírus pleomórficos, que acometem diversas localizações, principalmente a pele das extremidades, mucosa, pele genital e mucosa oral e laríngea. (Pereira *et al.*, 2011)

#### a) Epidemiologia, transmissão e patogênese

As verrugas têm uma incidência estimada entre 7% a 10% na população europeia e a 1% na população americana. Nos imunodeprimidos, por exemplo, nos receptores de transplante renal, esses números aumentam 50 a 100 vezes, chegando por vezes a mais de 90% após 15 anos do transplante. As verrugas ocorrem em qualquer idade e a incidência aumenta com a idade escolar, tendo um pico na adolescência e nos adultos jovens. (Pereira *et al.*, 2011)

O HPV é transmitido pelo contacto direto ou indireto com o indivíduo que tem a lesão. Traumatismos, pequenas agressões ou macerações que tenham provocado disfunções na barreira epitelial, provocam perda de continuidade na pele, possibilitando a infecção viral. Após a inoculação, o período de incubação varia de três semanas a oito meses. Contudo ocorre regressão espontânea na maioria dos casos. (Pereira *et al.*, 2011)

A imunidade mediada por células (IMC) parece ter um papel importante na resposta do hospedeiro ao HPV. Em pacientes com depressão da IMC, como os recetores de transplante renal, os indivíduos com infecção pelo HIV e pacientes com EV, observa-se maior prevalência de verrugas e quadros mais extensos e persistentes. (Pereira *et al.*, 2011)

#### b) Características histopatológicas das verrugas cutâneas

As características histopatológicas presentes nas verrugas virais são papilomatose, hiperqueratose proeminente com paraqueratose, hipergranulose e acantose.

Nas verrugas vulgares, as cristas epidérmicas são alongadas e, na periferia da lesão, apontam radialmente para o centro (arborização). As características mais importantes para distinguir a verruga vulgar dos demais papilomas são: a) coilocitos (células pequenas vacuolizadas com núcleo pequeno redondo fortemente basófilo, rodeado por um halo redondo fortemente basófilo, rodeados por um halo claro e citoplasma que se cora palidamente, localizadas na camada granulosa e espinhosa alta); representam o efeito citopático viral; b) barras verticais de paraqueratose; c) focos de grânulos de querato-hialina. Estas três alterações são muito evidentes nas verrugas vulgares jovens ou ativas. (Pereira *et al.*, 2011)

O exame histopatológico auxilia na identificação dos diferentes tipos virais, visto que geralmente cada tipo de HPV tem determinadas características histológicas. Contudo há autores que discordam quanto a diferentes HPV determinarem padrões histológicos distintos e característicos para cada tipo viral, portanto, não haveria correlação da histológica com o tipo de HPV. As verrugas planas apresentam hiperqueratose e acantose. A papilomatose e as áreas

de paraqueratose não menos proeminentes, observando-se apenas um discreto alongamento das cristas epidérmicas. Nas camadas espinhosa e granulosa há vacuolização difusa e aumento de tamanho das células, com centralização dos núcleos, que se tornam picnóticos e fortemente basofílicos. As verrugas palmoplantares profundas (mirmécia), por sua vez são caracterizadas por apresentarem na camada granulosa e espinhosa grânulos de querato-hialina abundantes e eosinófilos, formando corpos de inclusão irregulares nos citoplasmas dos queratinócitos. (Pereira *et al.*, 2011)

## 2. Verruga Vulgar (VV)

A verruga vulgar consiste em pápulas ou nódulos individualizados, com superfície áspera (figura 15). As lesões podem ser únicas ou múltiplas, de tamanhos variados, e habitualmente são assintomáticas. A confluência das lesões pode formar grandes massas. Ocorrem em qualquer parte do tegumento, porém são mais comuns no dorso das mãos e dos dedos. Nas crianças é mais frequente no joelho (figura 16). (Pereira *et al.*, 2011)

As verrugas isoladas podem permanecer inalteradas durante meses ou anos ou então, pode haver um desenvolvimento de um grande número de lesões num curto espaço de tempo. A evolução das verrugas não é previsível. Aproximadamente 65% das verrugas desaparecem espontaneamente num espaço de dois anos. A idade do paciente e o número de lesões não parecem influenciar o prognóstico. (Pereira *et al.*, 2011)

Os tipos de HPV mais frequentemente envolvidos nas lesões de VV são HPV 2, HPV 27, HPV 57, HPV 4 e HPV 1. O HPV 7 é o tipo mais encontrado nas verrugas de açougueiros e foi também descrito nos manipuladores de peixe e de aves domésticas. (Pereira *et al.*, 2011)



Figura 15: Verruga vulgar no dorso do terceiro quirodáctilo direito. (Pereira et al., 2011)



Figura 16: Verruga Vulgar em criança. (“Infestética,” n.d.)

### 3. Verruga Plantar

A verruga plantar ocorre na região plantar e é uma verruga viral. Pode ser profunda, e nessa forma apresenta-se como uma mircénia. Geralmente apresenta-se como dolorosa e causada pelo HPV 1. Quando se desenvolve mais superficialmente, forma placas hiperqueratóticas, e denomina-se verruga em mosaico, que é menos dolorosa e habitualmente causada pelo HPV 2 (figura 17). O HPV4 também é detetado em lesões de verrugas plantares. (Pereira *et al.*, 2011)

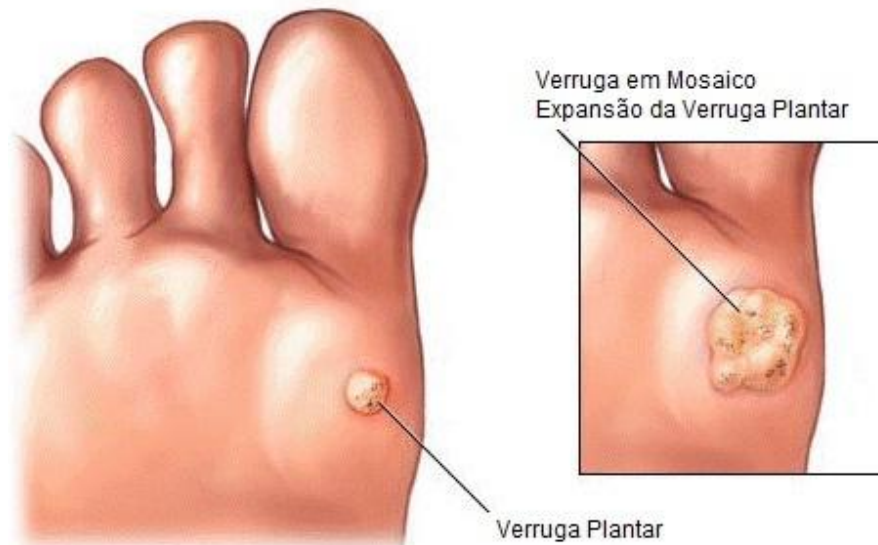


Figura 17: Imagem ilustrativa de uma verruga Plantar e de uma verruga em mosaico. (“Podologistas Elma Duarte,” n.d.)

#### 4. Verruga Plana

As verrugas planas são levemente elevadas, da cor da pele ou pigmentadas (acastanhadas, levemente amareladas), com superfície plana, lisa ou ligeiramente áspera (figura 18). Apresentam-se arredondadas ou poligonais e o tamanho varia de 1 mm a 5 mm de diâmetro ou mais. A face e o dorso das mãos são as localizações mais frequentes onde estas surgem. O número de verrugas pode ser elevado. Ocorre com frequência uma distribuição linear das lesões, correspondendo a lesão escoriada ou outro trauma (fenómeno de Koebner). A regressão espontânea é comum, geralmente precedida de inflamação das lesões. Os tipos de HPV mais detetados nas lesões de verrugas planas são o HPV 3 e o HPV 10. (Pereira *et al.*, 2011)



Figura 18: Verruga plana no tornozelo. (Pereira et al., 2011)

## 5. Verruga Filiforme

A verruga filiforme consiste em lesões pedunculadas, espiculadas, de crescimento perpendicular ou oblíquo à superfície da pele (Figura 19 e figura 20). Apresenta-se como lesões isoladas ou múltiplas, acometendo, essencialmente a face e o pescoço. É uma variante morfológica distinta da verruga vulgar e os tipos de HPV encontrados parecem ser os mesmos detetados nas lesões de verruga vulgar, em especial, o HPV 2. (Pereira et al., 2011)

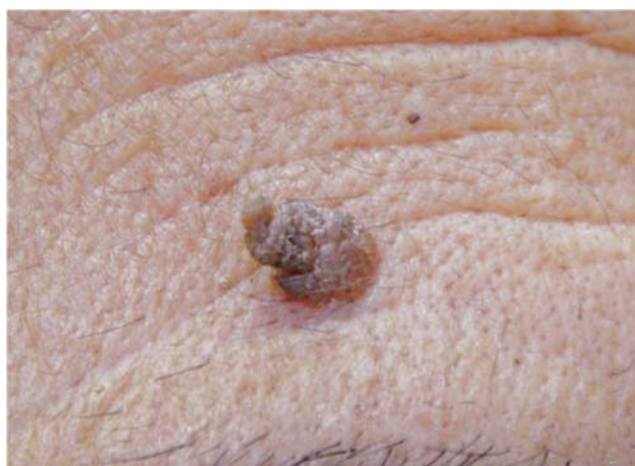


Figura 19: Verruga filiforme em recetor de transplante renal. (Pereira et al., 2011)



Figura 20: Verruga Filiforme na face. (“Saúde,” n.d.)

## 6. Verruga pigmentada

As verrugas pigmentadas apresentam clinicamente uma coloração entre cinza e castanho-enebecido (figura 21). Histopatologicamente apresenta corpos de inclusão citoplasasmáticos homogêneos específicos. Os tipos de HPV detetados nessas lesões são: HPV 4, HPV 6 e HPV 65. (Pereira *et al.*, 2011)



Figura 21: Verruga pigmentada (Pereira *et al.*, 2011)

## 7. Epidermodisplasia Verruciforme

A Epidermodisplasia Verruciforme é uma doença genética rara, de transmissão autossômica recessiva, em que há um distúrbio de imunidade celular e alta suscetibilidade a cancro de pele induzido pelo HPV. A associação entre HPV e cancro foi reconhecida pela primeira vez na década de 50 em pacientes com Epidermodisplasia Verruciforme. Estes possuem alta predisposição a infeções por um grupo específico de HPVs e alto risco de tumores cutâneos malignos, resultantes dos efeitos oncogénicos do vírus. As lesões de pele surgem precocemente na infância e são polimórficas. Na face e no pescoço são indistinguíveis das verrugas planas; no tronco e nos membros são máculas eritematosas hipopigmentadas, descamativas, semelhantes a pitíriase versicolor (figura 22 e figura 23). Placas mais espessas, rosáceas ou violáceas, semelhantes à ceratose seborreica, também são encontradas. Nas áreas foto-expostas há uma transformação maligna predominante entre a quarta e a quinta décadas de vida, sugerindo o papel importante dos raios ultra violeta. Observam-se lesões pré- malignas, como ceratoses actínicas, e lesões malignas, como doença de Bowen e carcinoma espinocelular invasivo. O carcinoma basocelular é raro nesses pacientes. Os tipos de HPV mais encontrados neste tipos de lesões são HPV 5, HPV 8, HPV 9, HPV 12, HPV 14, HPV 15, HPV 17, HPV 19- 25, HPV 28, HPV 29, HPV 36-38, HPV 47, HPV49 e HPV 50. Nas verrugas planas dos pacientes são detetados HPV 3 e 10, analogamente ao que acontece na população em geral. O HPV 5 e o HPV 8 são mais encontrados nas lesões malignas. Detetam-se com menos frequência os HPVs 14, 17, 20 e 47. (Pereira *et al.*, 2011)

Com a evolução das técnicas de identificação e tipagem de Epidermodisplasia Verruciforme começaram a ser observados não apenas em pacientes com diagnóstico desta doença mas também nas lesões e na pele de doentes imunodeprimidos e imunocompetentes. Esta epidermodisplasia é também encontrada em doentes com psoríase, nos indivíduos com distúrbio da proliferação de queratinócitos, doenças bolhosas e auto imunes e queimaduras. (Pereira *et al.*, 2011)



Figura 22: Verrugas planas epidermodisplasia verruciforme-símiles no recetor de transplante renal (Pereira et al., 2011)



Figura 23: Lesões verrucosas em Epidermodisplasia Verruciforme. (“Lauzurica,” n.d.)

#### 3.4.1.2. Lesões Cutâneas Malignas

##### 1. Doença de Bowen

A doença de Bowen é um carcinoma espinocelular *in situ* que evolui, ocasionalmente, para carcinoma invasivo. Encontra-se HPV nas lesões de doença de Bowen extragenital localizadas, sobretudo, na região periungueal, nas mãos e mais raramente nos pés. A detecção do vírus nessas localizações sugere

autoinoculação a partir das células genitais. O papel do HPV está bem estabelecido nas lesões da doença de Bowen genital, mas não está totalmente esclarecido nas formas extra-genitais. O encontro de HPV de alto risco em lesões de doença de Bowen extra-genital também ocorre na ausência de lesões genitais. Têm encontrado neste tipo de lesões os HPVs 2, 6, 11, 54, 58, 61, 62, 73, 58. HPVs mucosos de alto grau podem desempenhar um papel importante na patogênese da doença de Bowen extra-genital. (Pereira *et al.*, 2011)

## 2. Carcinoma Espinocelular e Basocelular

O papel exato do HPV no desenvolvimento do cancro de pele não melanoma – carcinoma espinocelular e carcinoma basocelular – ainda não está totalmente definido. Existem evidências crescentes que mostram que o HPV tem um importante potencial no processo de carcinogênese cutânea.

A associação do HPV com o cancro de pele não melanoma é observada em doentes imunossuprimidos ou imunocompetentes. Acima de 90% dos recetores de transplante renal, em quinze anos de transplante desenvolverão verrugas virais e 40% desenvolverão cancro de pele não melanoma, isto quer dizer que tem um risco de 50 a 100 vezes superior do que a população em geral. Neste grupo de pacientes observa-se uma prevalência superior de carcinoma espinocelular, ao contrário do que se observa na maioria das vezes na população como um todo. Nas lesões de carcinoma espinocelular dos recetores de transplante renal, os HPVs- Epidermodisplasia verruciforme são os mais encontrados. A positividade de deteção é alta, alcançando até 80-88%. (Pereira *et al.*, 2011)

Nos imunocompetentes, ainda há poucos trabalhos sobre HPV e lesões de cancro de pele não melanoma. Nesses indivíduos a prevalência de HPV é baixa, variando de 35-55% nas lesões de carcinoma espinocelular e chegando a 43,5% nas de carcinoma basocelular. Os HPVs- Epidermodisplasia verruciforme são também os tipos predominantes. Além deles, tipos cutâneos e mucosos têm sido detetados, porém nos estudos que os apontam como os mais comuns, observa-se que os métodos para a deteção dos tipos Epidermodisplasia verruciforme são limitados e insatisfatórios. (Pereira *et al.*, 2011)

### 3.4.1.3. Lesões Mucosas Benignas

#### 1. Papiloma Invertido

O Papiloma invertido schneideriano (PIS) é um tumor benigno, com origem no epitélio de revestimento, que surge na mucosa respiratória que reveste a cavidade nasal e os seios paranasais, também conhecido como membrana de Schneider. Três formas morfológicamente distintas de papilomas de Schneider podem ser distinguidas: o papiloma invertido, o papiloma oncocítico e o papiloma exofítico. O papiloma oncocítico não tem sido associado ao papilomavírus humano (HPV), em contraste com o papiloma invertido e o exofítico, com os quais podem sofrer a metaplasia escamosa e a proliferação verrucosa. Cerca de até 20% dos PIS podem apresentar graus variados de displasia epitelial, o que confere um potencial maligno a este tipo de tumor. Frequentemente, o PIS surge como uma lesão unilateral no septo nasal que se estende secundariamente para a cavidade nasal e os seios paranasais. (Piva *et al.*, 2011)

#### 2. Hiperplasia Epitelial Focal

A hiperplasia epitelial focal ou doença de Heck é uma doença rara da mucosa oral, de curso benigno e está associado ao HPV 13 e 32. Ocorre mais frequentemente em mulheres e crianças e apresenta uma predominância racial pelos índios americanos, esquimós e algumas comunidades africanas. Clinicamente apresenta-se como múltiplas pequenas pápulas, coloração rósea, individualizadas ou em forma de placas (Figura 25). As lesões são assintomáticas e com tendência a regressão espontânea. Localiza-se mais frequentemente no lábio inferior, contudo pode surgir, mas com menos frequência, no lábio superior, língua, mucosa jugal, orofaringe, palato e no assoalho da boca. (Pereira *et al.*, 2011)



Figura 24: Aspeto do lábio inferior de uma criança com 7 anos, do sexo masculino com doença de Heck. (“Dermis,” n.d.)



Figura 25: Hiperplasia epitelial focal ou doença de Heck em criança indígena do Parque Indígena do Xingu. (Pereira et al., 2011)

### 3. Condiloma Acuminado

O condiloma acuminado ou as verrugas anogenitais são as manifestações mais comuns de HPV na genitália. Estas lesões apresentam-se clinicamente como pápulas, nódulos ou vegetações macias, filiformes, róseas, sésseis ou pedunculadas. Podem apresentar um crescimento exofítico, semelhantes a uma couve-flor ou geralmente são assintomáticas. O HPV 6 e o HPV 11, HPVs de baixo risco, são geralmente os mais encontrados no condiloma acuminado. Pelo contrário os HPVs de alto risco, como o HPV 16 e o HPV18 e outros tipos de HPV, podem ser encontrados isolados, ou mais comumente, infectando juntamente com os HPVs 6 e 11. (Pereira *et al.*, 2011)

O tumor de Buschke-Löwenstein (condiloma acuminado gigante ou carcinoma verrucoso da região anogenital) é um tumor clinicamente agressivo, com lesões tipo “couve-flor”, ulcerados, geralmente associadas a fístulas e abscessos e associado ao HPV 6 e 11. Clinicamente apresenta um crescimento endofítico ou exofítico, com invasão local e altas taxas de recidiva. As metástases são muito raras e histologicamente têm um comportamento benigno. (Pereira *et al.*, 2011)

#### 4. Papulose Bowenoide

O termo papulose Bowenoide refere-se a lesões papulosas multifocais na genitália com características histológicas semelhantes às do carcinoma espinocelular *in situ* ou doença de Bowen. Clinicamente caracteriza-se por múltiplas pápulas de coloração acastanhada ou eritematosa localizadas na região anogenital, que surgem mais em adultos jovens com vida sexual ativa. A papulose Bowenoide deve ser diferenciada de queratose seborreica, nevo melanocítico e verruga comum. As lesões papulose Bowenoide estão fortemente relacionadas com o HPV 16. Apesar da atipia histológica e da associação com o HPV de alto risco, o curso da papulose Bowenoide no sexo masculino e em indivíduos jovens é geralmente benigna, ocorrendo regressão espontânea em muitos casos. No sexo feminino, a associação com neoplasia do colo uterino sugere um curso menos benigno, tanto para as mulheres que apresentam lesões como para as parceiras de homens com papulose Bowenoide. A evolução tende a ser mais agressiva em pacientes idosos e imunossuprimidos. HPVs 18, 31-35, 39-42, 48, e 51-54 têm sido também detetados em lesões de papulose Bowenoide. (Pereira *et al.*, 2011)

##### 3.4.1.4. Lesões Mucosas Malignas

#### 1. Doença de Bowen da Genitalia

O carcinoma *in situ* ou doença de Bowen da genitália associa-se aos HPVs de alto risco, especialmente o HPV 16. Clinicamente apresenta-se como uma placa, em

geral única, sem tendência para regressão espontânea e com potencial evolutivo para carcinoma espinocelular. Alguns autores defendem que a doença de Bowen na mucosa corresponde à eritroplasia de Queyrat. Contudo há outros investigadores que defendem que são entidades com padrões histológicos distintos. As características da Eritroplasia de Queyrat são placas eritematosas, aveludadas, brilhantes com ou sem infiltração e podem acometer a lande, prepúcio, uretra, vulva, mucosa oral, língua e conjuntiva. A progressão de eritroplasia de Queyrat para carcinoma espinocelular ocorre em mais de 30% dos casos e é maior do que a observada em relação à doença de Bowen. Estudos sobre a detecção do tipo de HPV nas lesões de eritroplasia de Queyrat são escassos. O HPV 16 é o mais encontrado e o HPV- Epidermodisplasia Verruciforme 8 também tem sido observado. (Pereira et al., 2011)

## 2. Cancro Vulvar

O cancro invasivo da vulva é geralmente precedido por neoplasia intra-epitelial vulvar ou carcinoma cervical e, muitas vezes desenvolve-se a partir de verrugas genitais de longa evolução. A detecção de carcinomas espinocelulares vulvares varia de 30% a 70%. A positividade de detecção do HPV no cancro vulvar é muito inferior à do carcinoma cervical, o que pode decorrer da sensibilidade dos métodos de detecção empregados ou da presença de novos tipos de HPV ainda não identificados que podem estar presentes nessas lesões. O HPV 16 é o tipo mais observado nos carcinomas vulvares, mas os HPVs 18, 21, 31, 33, 34 também tem sido encontrados nessas lesões. (Pereira et al., 2011)

## 3. Cancro Peniano

Clinicamente distingue-se por lesões endurecidas, nodulares, ulceradas ou erusivas e podem apresentar superfície verrucosa. A detecção de HPV nas lesões de cancro peniano alcança 40-70% de positividade e o tipo mais encontrado é o HPV 16. (Pereira et al., 2011)

#### 4. Cancro Anal

O HPV é detetado em cerca de 80% a 96% das lesões de cancro anal. O tipo de HPV mais encontrado é o HPV 16, contudo o HPV 18 e 33 também são detetados. (Pereira et al., 2011)

#### 5. Cancro cervical

Um grande número de lesões da região cervical estão associadas à presença de HPV, desde anormalidades citológicas insípides, displasias de diferentes graus, até ao cancro cervical (Figura 26). Observa-se a relação causal de HPV e cancro do colo do útero em cerca de 90% a 100% dos casos. A infeção cervical por alguns tipos de HPV é um fator precursor na génese da neoplasia cervical, embora outros cofactores atuem para que ocorra o desenvolvimento da neoplasia. (Pereira *et al.*, 2011)

Os HPV 16 e 18 são os dois tipos carcinogénicos mais importantes e responsáveis por cerca de 70% dos carcinomas cervicais e 50% das neoplasias intraepiteliais de grau III. Os HPVs 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52 e 58 também têm sido detetados nas lesões de cancro cervical. (Pereira *et al.*, 2011)

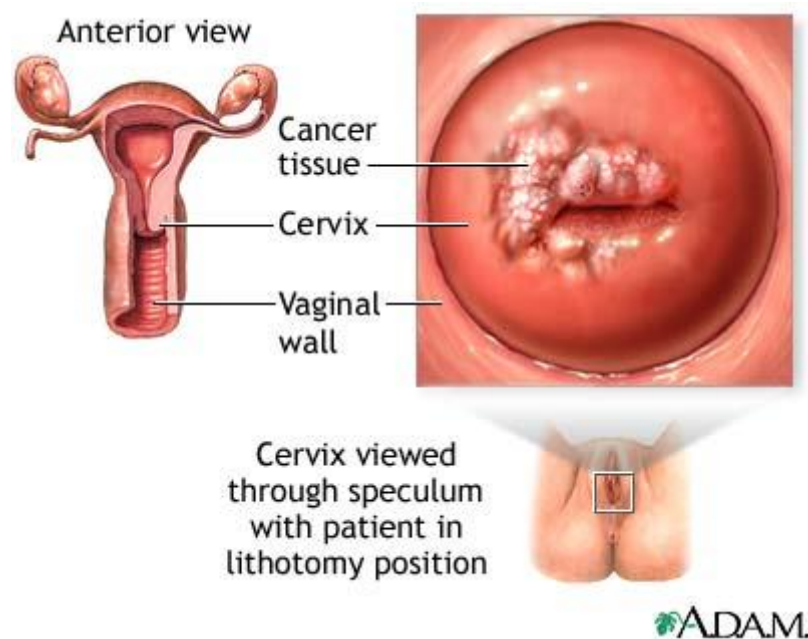


Figura 26: Imagem ilustrativa de cancro do colo do útero. (“Contraboli,” 2011)

Tipo de HPV	Quadros clínicos associados	Tipo de HPV	Quadros clínicos associados
1	Verruga plantar profunda, verrugas palmares, verrugas vulgares	32	Hiperplasia epitelial focal, papiloma laríngeos
2	Verrugas vulgares	33	NIC, NIV, câncer cervical
3	Verrugas planas	34	Verrugas orogenitais, doença de Bowen cutânea
4	Verrugas vulgares, verrugas plantares endofíticas	35	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
5	EV, CEC em EV	36 – 38	EV
6	Verrugas anogenitais, papilomas laríngeos, tumor de Buschke-Löwenstein, NIC	39	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
7	Verruga do açougueiro	40	Verrugas anogenitais, NIC, NIV, NIP, lesões cutâneas (raro)
8	EV, CEC em EV	41	Verrugas planas, CEC
9	EV	42, 43	Verrugas anogenitais
10	Verrugas planas	44	Verrugas orogenitais
11	Verrugas anogenitais, NIC, papilomas laríngeos	45	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
12	EV	46	Reclassificado como HPV-20b, EV
13	Hiperplasia epitelial focal	47	EV, CEC em EV
14	EV, CEC em EV	48	Verrugas cutâneas (raro), CEC em imunodeprimido
15	EV	49	EV, verrugas planas em imunodeprimido
16	Verrugas anogenitais, NIC, NIV, NIP, carcinoma cervical	50	EV
17	EV, CEC em EV	51	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
18	Verrugas genitais, NIC, carcinoma cervical	52, 53	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
19	EV	54	Verrugas anogenitais, tumor de Buschke-Löwenstein (raro)
20	EV, CEC em EV	55	Verrugas orogenitais, papulose Bowenóide
21 – 25	EV	56	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
26	Lesões cutâneas em imunodeprimidos, raramente lesões genitais	57	Verrugas orogenitais, verrugas cutâneas
27	Verrugas vulgares	58	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical
28	Verrugas planas e vulgares	59	Verrugas orogenitais
29	Verrugas vulgares (raro)	60	Cisto plantar epidermóide
30	Lesões anogenitais, carcinoma laríngeo	61, 62	NIV
31	Verrugas anogenitais, NIC, carcinoma cervical	63	Verrugas cutâneas (raro), verrugas pares
64	Verrugas orogenitais, NIV	84	Lesões mucosas de baixo risco
65	Verrugas planas pigmentadas	85	Lesões mucosas de alto risco
66 – 68	Verrugas anogenitais, NIC, câncer cervical	86	Lesões mucosas de baixo risco
69	NIC	87	Lesões mucosas de baixo risco
70	Verrugas anogenitais	88	Lesões cutâneas
72	Lesões cervicais	89	Lesões mucosas de baixo risco
73	Verrugas anogenitais	90	Lesões mucosas de baixo risco
75 – 77	Lesões cutâneas em imunodeprimidos	91	Lesões mucosas de baixo risco e lesões cutâneas
78	Lesões cutâneas, lesões mucosas (raro)	92	EV, lesões cutâneas pré-malignas, CEC
80	EV, CEC	93	EV, lesões cutâneas pré-malignas, CEC
81	Lesões mucosas de baixo risco	94	Lesões cutâneas, lesões mucosas (raro)
82	Lesões mucosas de alto risco, lesões benignas	95	Lesões cutâneas
83	Lesões mucosas de baixo risco	96	EV, lesões cutâneas pré-malignas, CEC
		107	EV, CEC

Tabela 1: Principais manifestações clínicas causadas por diferentes tipos de HPV (Pereira et al., 2011)

### 3.5. ASPETOS CLÍNICOS DAS LESÕES ORAIS POR HPV

O diagnóstico das lesões da cavidade oral por HPV é feito através das características clínicas da lesão, tais como: cor branca ou violeta, dependendo do grau de queratinização da mucosa, superfície rugosa, bordos pronunciados e irregulares, sésseis

ou pediculados, únicas ou múltiplos e geralmente assintomática. As características clínicas da maioria dos papilomas orais é que são pequenos e não excedem 1cm embora às vezes possam ser lesões ainda maiores que 3 cm (figura 27). Eles podem ocorrer em qualquer idade, entre a terceira e a quinta década de vida e podendo surgir ocorrer em qualquer parte da cavidade oral, sendo a localização mais frequente a face interna do lábio, palato duro e palato mole, úvula e bordo lateral da língua. O carcinoma oral de células escamosas apresenta-se como uma lesão elevada (figura 28), no entanto, quando são lesões planas não podem ser identificados por simples observação clínica motivo pelo qual se deve aplicar ácido acético ou de azul de toluidina a 2 %. No entanto, este processo de identificação de lesões orais na cavidade oral é questionada, uma vez que outro tipo de lesões não relacionadas com o HPV também tendem a ficar com uma cor esbranquiçada (figura 29).



Figura 27: Papiloma no bordo esquerdo da úvula (Medina et al., n.d.)



Figura 28: Carcinoma espinocelular oral no rebordo alveolar. (Medina et al., n.d.)



Figura 29: Leucoplasia da Língua. (Medina et al., n.d.)

Já se calculou que entre o contágio e o aparecimento de alguma lesão pode haver um período que oscila entre 3 meses até vários anos. Estão também reportados casos em que há a presença do vírus e não existe lesão nenhuma. (Medina M. L., 2009)

### **3.6. ASSOCIAÇÃO DOS TIPOS DE HPV COM AS LESÕES ORAIS**

Existem mais de 75 genótipos de HPV. Os tipos de HPV que se incluem nas lesões orais são o 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 31, 32, 33, 35 e 57. (Medina et al., n.d.) Os tipos de HPV 13 e 32 são exclusivos da cavidade oral. (Ronell, 2005) Estes vírus possuem epiteliotropismo e induzem lesões hiperplásicas marcadas como: vegetações, verrugosidades e papilomas tanto da mucosa oral como da pele. A maioria é de baixo grau de risco (não- oncogénicos) e estão associados com lesões papilomatosas benignas; os HPV 6 e 11 estão associados ao papiloma oral e são considerados subgrupos mais comumente encontrados na cavidade oral; os HPV 6 e 4 estão associados com às verrugas vulgares; o HPV 11 está associado ao condiloma acuminado; os HPVs 13 e 32 estão associados à hiperplasia epitelial focal e têm baixo potencial de progressão maligna. Em contraste, genótipos de alto risco (oncogénicos) como os HPV 16, 18, 31, 33 e 35, que estão associados à leucoplasia e ao carcinoma espinocelular são também, considerados desde 1995, carcinogénicos sobre base epidemiológica e moleculares pela Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC, Lyon, França), pertencente à OMS.

O HPV-16 é o genótipo detetado com mais frequência em leucoplasias (40%), e no carcinoma oral das células escamosas (33,3%). Não se encontraram nenhuma relação significativa entre a presença de genoma viral e as variáveis clínico-patológicas

principais. De acordo com estes resultados, a presença de HPV-16 está significativamente associada com a leucoplasia oral e com as lesões de células escamosas orais, por conseguinte, o vírus pode ser um componente cancerígeno na doença.

Foi detetado HPV em lesões benignas, pré-maligna e malignas da cavidade oral. Entre as lesões orais benignas estão o papiloma oral, a verruga vulgar oral, o condiloma acuminado oral e hiperplasia epitelial focal, a hiperplasia fibrosa, a hiperplasia papilar; entre as pré-malignas ou malignas incluem-se lesões produzidas pela ação do tabaco, queratose, queratoquisto odontogénico, ameloblastoma, líquen plano oral, leucoplasia pilosa, carcinoma espinocelular. (Medina et al., n.d.)

### **3.7. IMPLICAÇÕES DA PRESENÇA DE DNA DE HPV NA MUCOSA ORAL NORMAL**

Há pouca informação sobre a prevalência do DNA do HPV em mucosa oral clinicamente saudável. No entanto, tem sido demonstrado em alguns tipos de documentos científicos a presença oncogénica de tipos HPV de alto risco oncogénico, em amostras normais da mucosa bucal. Os subtipos mais frequentes são: o HPV 16 (10%) e o HPV 18 (11%). O significado deste achado é desconhecido e pode-se pensar que o vírus ainda não produziu lesão ou, em muitos casos, as lesões podem regredir espontaneamente. No entanto, a proporção é muito mais baixa do que o mostrado nos carcinomas. (Cavenaghi et al., 2013) Alguns autores demonstraram que a infeção por HPV de alto risco pode ser um co-fator na carcinogénese oral e que a infeção latente é comum. A presença do vírus do papiloma humano não é suficiente para causar a transgressão maligna, sendo provavelmente necessárias alterações genéticas adicionais para uma progressão a um estágio neoplásico. A descoberta do DNA do HPV em mucosa normal, salienta que o próprio vírus não pode ser associado a malignidade, visto que o curso clínico da infeção pode ser a regressão, a persistência ou a progressão de acordo com vários co-fatores, tais como compromisso imunitário, tabagismo, deficiências nutricionais, a ação hormonal, o alcoolismo e a predisposição genética. O DNA do HPV foi encontrado em amostras de indivíduos saudáveis orais em diversos estudos, deixando claro que a mucosa oral pode atuar como um reservatório para novas infeções por HPV e/ou uma fonte de recidiva de lesões por HPV. (Castro & Bussoloti Filho, 2006)

A frequência da infecção por HPV em mucosa oral normal é de 3% a 5% em adolescentes e 5% para 10% em adultos. A taxa de prevalência foi maior entre os homens do que as mulheres. Embora a infecção por HPV possa ser transmitida por diferentes vias (sexuais e não sexuais), numerosos estudos suportam o facto de que a prevalência de HPV oral em adultos está aumentada com o número de parceiros sexuais e é mais comum em homens, infetados pelo HIV, e em consumidores de tabaco. Particularmente beijos de boca aberta e sexo oral, são significativamente mais associados com a transmissão do vírus HPV oral. A transmissão do vírus HPV durante o sexo vaginal mostrou-se mais comum a partir de um colo infetado para o pénis do que vice-versa. A via preferencial de transmissão viral pode ser extrapolada para a cavidade oral, bem como, o que poderia explicar a razão pela qual a infecção pelo HPV oral é mais comum nos homens do que nas mulheres. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014)

### **3.8. HPV E AS LESÕES ORAIS PRÉ-MALIGNAS**

Os dados apresentados reforçam o papel da infecção pelo HPV em várias doenças benignas e malignas. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014)

Contudo, durante os últimos anos colocou-se mais em evidência o envolvimento do HPV no desenvolvimento de lesões pré-cancerígenas e do carcinoma espinocelular da cavidade oral. A alta prevalência da infecção por este vírus no caso de lesões orais pré-malignas, indica que a infecção poderia ser um evento inicial do processo de transformação maligna. A associação epidemiológica do HPV com o carcinoma espinocelular, assim como as evidências biológicas dadas pela transformação de células epiteliais por oncogenes virais sugerem que os HPVs específicos são importantes para o processo de transformação maligna, sem que este determine o tamanho e o estado do tumor. A deteção precoce de lesões orais pré-cancerígenas associadas ao HPV é essencial para o tratamento oportuno do paciente. Além disso, a persistência da infecção pelo HPV em lesões orais é importante, especialmente se for associado a hábitos tabágicos, alcoólicos, uso de anti-concepcionais, onicofagia, entre outros. A combinação de fatores de risco pode potenciar alterações celulares de lesões clinicamente benignas com transformações pré-malignas e/ou maligna da cavidade oral. (Medina *et al.*, n.d.)

### **3.9. ASSOCIAÇÃO DO CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO COM O HPV**

O papel do HPV na patogénese do carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço foi sugerido pela primeira vez em 1983, quando as características histopatológicas, consistentes com a infeção pelo HPV foram identificadas em cancros orais. (Gillison, 2008)

O carcinoma de cabeça e pescoço pertence a um grupo heterogéneo de cancros que incluem os cancros da cavidade oral, dos seios para-nasais, da nasofaringe, da orofaringe, da hipofaringe e da laringe. Os tumores das glândulas salivares mostram diferenças dos carcinomas mais comuns das outras localizações do cancro de cabeça e pescoço em termos de epidemiologia, de histopatologia, de apresentação clínica e do tratamento. (Beachler & D'Souza, 2013; Zonta *et al.*, 2012)

Mais de 90% dos cancros orofaríngeos e dos cancros orais diagnosticados cada ano são carcinomas espinocelulares orais. (Daley *et al.*, 2014; Galbiatti *et al.*, 2013)

#### **3.9.1. Incidência e epidemiologia**

O cancro de cabeça e pescoço é uma doença bastante relevante na saúde, representando a 5ª maior causa de cancro e a 6ª maior causa de mortes por neoplasia no mundo. Por ano surgem mais de meio milhão de casos novos. Na América do Norte e Europa, os tumores originam-se geralmente da cavidade oral, orofaringe ou laringe, enquanto que nos países do mediterrâneo e no extremo oriente são mais comumente originados na nasofaringe. (Barroso *et al.*, 2014)

Em Portugal, o cancro de cabeça e pescoço é o quinto com maior incidência em ambos os sexos, sendo que o da cavidade oral tem uma incidência de 6,8/100 000 habitantes, faringe 5,0/100 000 e laringe 4,7/100 000. A mortalidade é de 1,9/100 000 na cavidade oral, 2,1/100 000 na faringe e 1,8/100 000 na laringe. (Esteves, 2013)

A incidência do cancro da cavidade oral está a diminuir havendo no entanto, um aumento da incidência de cancro da orofaringe, o que pode refletir mudanças de comportamentos: como alterações no consumo de tabaco. Esta tendência é mais relevante nos homens, embora também presente no sexo feminino. (Auluck *et al.*, 2010)

Em contrapartida, verificou-se um aumento na incidência de cancro da orofaringe. Estes cancros parecem ser causados principalmente por infecção de HPV que podem ser transmitidas através do aumento das práticas de sexo oral. A crescente aceitação social do sexo antes do casamento, múltiplos parceiros sexuais e sexo oral nas últimas décadas, já devem ter contribuído para o aumento da infecção de HPV oral. Essa possibilidade é apoiada por um estudo recente dos EUA que relatou uma associação entre sexo oral e beijos de boca aberta com o desenvolvimento da infecção oral por HPV. (Auluck *et al.*, 2010)

A incidência de carcinoma espinocelular orofaríngeo HPV-positivo está a aumentar significativamente. Estima-se que em 2008 ocorreram 85 mil casos de cancros da orofaringe em todo o mundo, e pelo menos 22 mil destes eram HPV positivos. Entre 1988 e 2004, houve um aumento de 225% da população com carcinoma espinocelular orofaríngeo HPV-positivo nos Estados Unidos (a partir de 0,8 casos por 100.000 indivíduos em 1988 para 2,6 por 100 mil em 2004) e uma diminuição concomitante de 50% dos carcinomas espinocelulares orofaríngeos HPV-negativos (a partir de 2,0 casos por 100.000 indivíduos em 1988 para 1,0 por 100 mil em 2004 (figura 4). A percentagem de casos que foram carcinomas espinocelulares orofaríngeos HPV-positivo aumentou de 16,3% no período 1984-1989 para mais de 70% em 2000-2004 nos Estados Unidos. Houve um aumento da taxa percentual anual de 5% na incidência do carcinoma espinocelular orofaríngeo nos Estados Unidos e um aumento de 6 % na Finlândia. Os investigadores estimam que até 2020 a incidência de HPV- carcinoma espinocelular orofaríngeo positivo será maior do que a incidência de cancro do colo do útero, e até 2030 metade de todos os cancros de cabeça e pescoço estará relacionada com HPV. (Pytynia *et al.*, 2014)

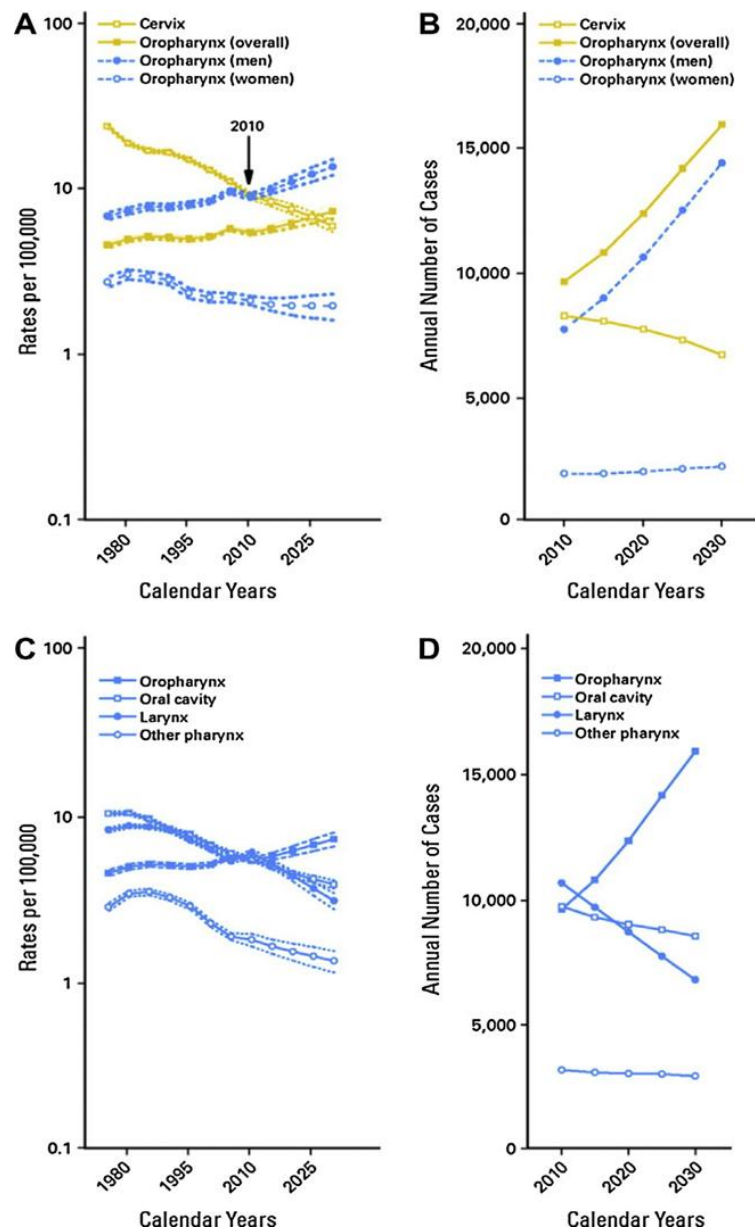


Gráfico 2: (A) Taxas de incidência observadas e projetadas com *bootstrap* de 95% (idades entre 30-84 anos) para cancro de orofaringe gerais (quadrados sólidos), cancro de orofaringe entre os homens (círculos sólidos), cancro de orofaringe entre as mulheres (círculos abertos) e cancro do colo do útero (quadrados abertos). (B) Número projetado de pacientes (com idades entre 30-84 anos) de cancro de orofaringe em geral, cancro de orofaringe entre os homens, cancro de orofaringe entre as mulheres, e cancro do colo do útero até ao ano de 2030. (C) Taxas de incidência observadas e projetadas de cancro da orofaringe (sólido quadrados), da cavidade oral (quadrados abertos), laringe (círculos a cheio), e outra da faringe (círculos abertos). (D) Numero projetado de pacientes com cancro da orofaringe, cavidade oral, laringe, faringe e outros tipos de cancro até ao ano de 2030. As Taxas de incidência observadas durante 1973-2007 de nove registos dentro do programa de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais foram usados em modelos idade - período - coorte para projetar incidência esperada até ao ano 2030. As taxas de incidência projetadas foram aplicadas às projeções populacionais americanas em 2008 para calcular o número anual de pacientes.

Os câncros da orofaringe incluem os câncros HPV-relacionados e HPV-independentes, porque as projeções foram realizadas para todos os locais de cancro de cabeça e pescoço. Os câncros da orofaringe, da cavidade oral, da laringe, da faringe e de outros tipos eram restritos a histologias de células escamosas. Os câncros cervicais incluíram todos os subtipos histológicos. (Pytynia *et al.*, 2014)

O aumento dos carcinomas espinocelular orofaríngeos relacionados com o HPV está bem documentado na América do Norte. Tal tendência não tem sido bem estabelecida em alguns países da Europa como Portugal, América do Sul, África e Ásia. Pois os estudos de base populacional nessas regiões são limitados ou inexistentes, existem de diferentes culturas de práticas sexuais e há um aumento das taxas de tabagismo, o que também pode obscurecer essas tendências. Nos Estados Unidos, o aumento do carcinoma espinocelular orofaríngeo HPV- positivo é maior entre os homens brancos de meia-idade (40-59 anos). (Pytynia *et al.*, 2014)

Apesar de estar reconhecida a importância do HPV em muitos câncros orofaríngeos, a epidemiologia da infecção por HPV oral ainda não foi bem entendida. Sabe-se que a infecção por HPV aumenta com a idade. A infecção por HPV oral tem uma prevalência de 3-5% em adolescentes e 5-10% em adultos. (Pytynia *et al.*, 2014)

Porque é que tem aumentado a incidência de HPV associado ao cancro orofaríngeo em jovens? Nas últimas décadas há uma diminuição na idade do início da atividade sexual e um aumento no número de parceiros sexuais, inicia-se numa idade mais precoce o sexo oral em comparação com gerações mais antigas, o que contribui para a exposição de HPV. (Auluck *et al.*, 2010; Marur, D'Souza, Westra, & Forastiere, 2010)

### **3.9.2. Etiologia e fatores de risco**

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é uma doença multifatorial, resultando assim, da interação de fatores ambientais e herança genética. (Galbiatti *et al.*, 2013; Kostareli *et al.*, 2013)

#### **ÁLCOOL**

O risco pode aumentar diretamente com a concentração de álcool (ex. consumo de bebidas destiladas em comparação com a cerveja e o vinho), mesmo após ajuste para total de álcool consumido. Não está esclarecido se o tipo de álcool consumido afeta o

risco para cancro oral após ajuste para total consumido e concentração de álcool. (Galbiatti *et al.*, 2013)

O álcool age como um solvente para aumentar a exposição da mucosa a agentes carcinogénicos, elevando a absorção celular dos mesmos. O acetaldeído, um metabolito do álcool, pode formar precursores de DNA que interferem na síntese e na reparação do DNA. (Galbiatti *et al.*, 2013)

## TABACO

Em relação ao tabaco, o fumo associado ao álcool aumenta 40 vezes o risco de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Os cigarros contêm aproximadamente 4700 substâncias, pelo menos 50 das quais carcinogénicas, incluindo nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos (Galbiatti *et al.*, 2013)

Contudo, também existem pessoas fumadoras e que ingerem álcool que não desenvolvem carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, indicando uma variação individual da suscetibilidade genética. Ainda assim há uma forte relação entre o fumo e o álcool. (Galbiatti *et al.*, 2013)

## HPV

As infeções por HPV contribuem com mais de 99% dos casos de cancro do colo do útero, 97% de cancros do ânus, 70% de cancros vaginais, 47% de cancros penianos, 40% de cancros vulvares, 28,2% a 47% de cancros orofaríngeos, 11% a 30% dos cancros da cavidade oral e na laringe entre 13,8% e 48,5%. (Cavenaghi *et al.*, 2013; Grce & Mravak-Stipetić, 2014) A disparidade de opiniões referente ao envolvimento do HPV no carcinoma espinocelular oral, poderá estar relacionada com a variabilidade geográfica (Colon-López *et al.*, 2014; Nelke, Łysenko, Leszczyszyn, & Gerber, 2013; Quintero *et al.*, 2013)

De acordo com os mais recentes estudos, a evidência mostra que o HPV de alto risco (HPV-16) tem um papel específico na principal causa de carcinoma espinocelular da orofaringe. (Jin *et al.*, 2013; Kostareli *et al.*, 2013; Nelke *et al.*, 2013) De entre os tumores HPV-positivos, o HPV 16 foi o genótipo mais frequente no carcinoma

espinocelular de cabeça e pescoço da orofaringe (86,7%), seguido por laringe (69,2%) e cavidade oral (68,2%). O HPV 18 foi o segundo genótipo mais frequente: 2,8% em carcinomas da orofaringe, 34,1% da cavidade oral e 17% da laringe. Embora as estimativas sejam variáveis nos diferentes estudos, a tendência dos achados é consistente. (Bottalico *et al.*, 2011; Daley *et al.*, 2014; Grce & Mravak-Stipetić, 2014; Jensen *et al.*, 2012; Nelke *et al.*, 2013; Quintero *et al.*, 2013)

A persistência da infecção pelo HPV é um fator de risco essencial para carcinogênese e inflamação crônica, e co-infecções bacterianas favorecem a infecção por HPV. A gengivite e periodontite crônica podem atuar como sinergicamente na história natural da infecção oral por HPV. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014)

O risco de infecção por HPV oral/orofaringe aumenta com o número de parceiros sexuais orais. Pacientes com carcinoma espinocelular orofaríngeo HPV-positivo são mais propensos a ter um número aumentado de parceiros sexuais (mais de 8-10). (Pytynia *et al.*, 2014)

## GENÉTICA

Vários polimorfismos genéticos nos genes envolvidos no metabolismo de agentes carcinogênicos, reparação do DNA ou em vários outros processos foram associados a risco de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, apesar dos resultados nem sempre serem consistentes. Já que a capacidade diferencial de metabolizar agentes carcinogênicos ocorre apenas no momento da exposição, também é possível que o risco familiar reflita tanto uma suscetibilidade genética aumentada para carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço como uma agregação de exposições. (Galbiatti *et al.*, 2013)

## OUTROS FACTORES

A exposição a agentes carcinogênicos, higiene oral deficiente, formação de placa bacteriana, irritação crônica da mucosa, histórico familiar, baixo índice de massa corporal e exposição a luz ultravioleta também têm um papel individualmente ou em conjunto, no desenvolvimento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, pois

podem modular o metabolismo de toxinas e agentes carcinogénicos. (Galbiatti *et al.*, 2013)

Doenças periodontais resultantes de má higiene oral podem levar a infeções com consequente libertação de mediadores inflamatórios tais como citocinas. As citocinas são um grupo de com função no sistema imunológico envolvidas na inflamação, imunidade, defesa contra a infeção pelo HPV e modulação da libertação do HPV. (Jin *et al.*, 2013) O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina multifuncional envolvida na resposta do hospedeiro à inflamação e na defesa contra as infeções virais. TNF- $\alpha$  podem estar envolvidos na carcinogénese através da indução da proliferação, invasão e metástase, pois podem ter atividades tanto de necrose tumoral como de promoção tumoral. (Jin *et al.*, 2013) Daí as reações contra a inflamação, por sua vez, podem promover o desenvolvimento de cancro. A perda de dentes pode também contribuir para o desenvolvimento de cancro oral, já que leva à alteração da flora oral e favorece a redução de nitritos e nitratos e a produção de acetaldeído, que leva à formação de precursores de DNA. (Galbiatti *et al.*, 2013)

### 3.9.3. Biologia e apresentação clínica

Variáveis do carcinoma espinocelular podem estar presentes na região oral ou nasofaríngea, mas não de forma comum em ambos os locais ao mesmo tempo. (Nelke *et al.*, 2013)

O carcinoma espinocelular oral é mais comum nos dois terços anteriores da língua, pavimento da boca, alvéolo, gengiva, palato duro e mucosa oral e labial. O local de ocorrência pode variar de acordo com a exposição aos diversos fatores de risco nas diferentes partes anatómicas da cavidade oral. O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço associadas ao HPV surge mais frequentemente por lingual e nas amígdalas palatinas. O HPV atinge preferencialmente, o epitélio reticulado altamente especializado que reveste as cristas amigdalinas; No entanto, ainda não foi reconhecido que esse epitélio contenha propriedades intrínsecas vulneráveis à infeção por HPV. Uma vez que o vírus integra o genoma de DNA no núcleo da célula hospedeira, este desregula a expressão das oncoproteínas E6 e E7. A proteína E6 induz a degradação de P53 através proteólise mediada por ubiquitina, levando à perda substancial da atividade da P53. A função normal de P53 é prender as células em G1 ou induzir a apoptose para

permitir que DNA seja reparado. As células E6 não são capazes de desencadear esta resposta mediada por P53 aos danos no ADN e, por conseguinte, são suscetíveis a instabilidade genómica. A proteína E7 vai ligar-se e inativa o gene supressor de tumor do retinoblastoma, pRB, fazendo com que a célula entre na fase S, o que conduz ao rompimento do ciclo celular, proliferação, e transformação maligna. (Marur *et al.*, 2010)

Morfologicamente, os carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço são normalmente caracterizados como moderadamente diferenciados, mas os carcinomas HPV-positivos desviam-se desse tipo. As características consistentes destes tumores são: que estes surgem nas cristas amigdalinas; não são associados com displasia do epitélio superficial; mostram um crescimento lobular; permitem a permeabilização por linfócitos infiltradores; não sofrem clinicamente significativa queratinização hipocrisia; e têm uma morfologia basalóide. (Marur *et al.*, 2010; Pytynia *et al.*, 2014)

Clinicamente, os tumores HPV-positivo apresentam-se principalmente numa fase inicial e no estadio T nodal avançado (tabela 2). Em geral, o cancro de orofaringe associado ao HPV apresentam-se no estadio III ou IV. Metástases linfáticas são geralmente quísticas e múltiplas. (Marur *et al.*, 2010)

Pacientes com carcinoma espinocelular orofaríngeo HPV- positivos são mais propensos a apresentar-se com pequenos tumores primários e afetação linfática mais ampla. Porque pequenos tumores de orofaringe primários não são suscetíveis de ser sintomáticos, e a maioria dos pacientes procuram tratamento médico devido a doença linfática sintomática. A afetação linfática pode ser quística, o que pode dificultar o diagnóstico para os médicos que não estão familiarizados com o processo da doença, e erros de diagnóstico como um quisto benigno não é incomum. É importante para o médico inicial reconhecer que nem todos os carcinomas espinocelulares do trato aerodigestivo superior ocorrem em fumadores e consumidores de álcool, especialmente em pacientes com carcinoma espinocelular orofaríngeo relacionados com HPV onde muitas vezes nem apresentam outros fatores de risco. Esses pacientes também podem apresentar uma idade mais jovem do que um paciente típico com cancro de cabeça e pescoço e com queixas de massa cervical ou outros sintomas relacionados com o trato aerodigestivo superior devem ser cuidadosamente avaliados. (Pytynia *et al.*, 2014)

	<b>Tumores HPV-positivos</b>	<b>Tumores HPV-negativos</b>
<b>Local Anatômico</b>	Amígdalas e base da língua	Em qualquer local
<b>Histologia</b>	Não queratinizado	Queratinizado
<b>Idade</b>	População jovem	População de qualquer idade
<b>Sex-ratio</b>	3:1 homens	3:1 homens
<b>Estádio</b>	Tx, T1-2	Variável
<b>Factores de risco</b>	Comportamento sexual	Álcool e tabaco
<b>Incidência</b>	Em crescimento	Em decréscimo
<b>Sobrevivência</b>	Melhor	Inalterável

Tabela 2: Diferenças entre o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço HPV positivo e HPV negativo. (Marur *et al.*, 2010)

#### 3.9.4. Estadiamento

O estadiamento do cancro oral é clínico, e deve ser baseado na estimativa da extensão da doença antes do tratamento. A avaliação do tumor primário é feita através da realização da história clínica, exame objetivo (inspeção, palpação, quando possível, e por observação indireta com espelho ou direta, através de endoscopia se for necessário) e com o recurso a exames auxiliares. O tumor deve ser confirmado histologicamente e qualquer outro dado patológico obtido na biopsia deverá ser incluído. As áreas de drenagem linfáticas correspondentes à localização tumoral devem ser cuidadosamente inspecionadas e palpadas. No caso de recaída deve ser efetuado um novo estadiamento e selecionada a terapia adicional apropriada. No estadiamento do cancro de cabeça e pescoço utiliza-se a classificação TMN da *American Joint Committee on Cancer*. (National Cancer Institute, 2014).

---

TX	Tumor primário não pode ser avaliado
----	--------------------------------------

---

T0	Sem evidência de tumor
----	------------------------

---

Tis	Carcinoma <i>in situ</i> .
-----	----------------------------

---

T1	Tumor $\leq 2$ cm na sua maior dimensão.
----	--

---

T2	Tumor $> 2$ cm mas $\leq 4$ cm na sua maior dimensão.
----	---

---

T3	Tumor $> 4$ cm na sua maior dimensão.
----	---------------------------------------

---

T4a	Doença local moderadamente avançada (ressecável)
-----	--

---

	Lábio: o tumor invade estruturas adjacentes (p.ex. pavimento da boca)
--	---

---

	Cav. Oral : o tumor invade estruturas adjacentes (cortical óssea mandibular, músculos extrínsecos da língua, seio maxilar, pele)(*)
--	---

---

T4b	Doença local muito avançada. (irressecável)
-----	---

---

	Cav. Oral: invade espaço mastigatorio, apófises pterigoideas, base do crânio, infiltra carótida int.
--	--

---

\* A erosão superficial isolada do osso e alvéolo dentário pelo tumor gengival, não deverá ser critério para classificação T4

---

Tabela 3: Estadiamento do tumor primário. (Grupo de cabeça e pescoço, 2012)

---

NX	Nodulo linfático regional não pode ser avaliado (ex. Previamente removidos)
----	---

---

N0	Nenhuma evidência de metástase nos gânglios
----	---

---

N1	Metástases num único gânglio ipsilateral, até 3 cm na sua maior dimensão.
----	---

---

	a Metástases num único gânglio entre 3 e 6 cm na maior dimensão
--	---

---

N2	
----	--

---

	b Metástases em múltiplos gânglios ipsilaterais, nenhum maior que 6 cm
--	--

---

c Metástases em gânglios bilaterais ou contra laterais, nenhum maior que 6 cm

N3 Metástases num gânglio com mais de 6 cm na sua maior dimensão

Nota: Gânglio na linha média são considerados “ipsilaterais”.

Tabela 4: Gânglios Linfáticos Regionais (N). (Grupo de cabeça e pescoço, 2012)

Mx Presença de metástases à distância não pode ser avaliada

M0 Nenhuma evidência de metástases

M1 Metástases a distância

Tabela 5: Metástases à Distância. (Grupo de cabeça e pescoço, 2012)

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
IV a	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0

<b>Estadio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
IV b	Any T	N3	M0
	T4b	Any N	M0
IV c	Any T	Any N	M1

Tabela 6: Grupos de Estadiamento. (Grupo de cabeça e pescoço, 2012)

### **3.9.5. Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço relacionado com o HPV e respetivo tratamento**

Todos os doentes devem ser presentes em consulta de decisão terapêutica (CDT) no início e no final da/s terapêutica/s. Nesta reunião, os doentes estadiados deverão ser presentes com todos os elementos necessários para avaliação e proposta terapêutica. A marcação da data da intervenção cirúrgica e tratamentos de Radioterapia e Quimioterapia no ato da Decisão Terapêutica constitui um critério de qualidade, pelo que sempre que possível deverá ser efetuada. (Grupo de cabeça e pescoço, 2012)

A decisão sobre qual a terapêutica escolhida é baseada em vários critérios, mas de maneira geral, o protocolo de tratamento nos tumores de cabeça e pescoço é amplamente baseado no estadio, região anatomia e estado geral do doente. (Grupo de cabeça e pescoço, 2012)

Nos estadios I e II as técnicas indicadas são cirurgia e/ou radioterapia. A escolha entre estes métodos reside principalmente na localização do tumor, e da capacidade residual do orgão ou zona atingida. (Grupo de cabeça e pescoço, 2012)

Para os estadios III e IV sem metástases à distância, o tratamento é orientado pela ressecabilidade do tumor (critério de ressecabilidade tabela X). Os tumores ressecáveis, e no caso de possível preservação do órgão, é aconselhada quimioterapia de indução (Al-Sarraf (PF), TPF), seguida de avaliação após segundo ciclo, se houver RC ou RP maior de 50%, segue-se mais um ciclo de QT com RT concomitante ou RT isolada. Caso RP menor de 50%, cirurgia com RT. (Grupo de cabeça e pescoço, 2012)

Se o tumor for considerado irressecável a proposta de tratamento será geralmente RT com QT concomitante ou tratamento paliativo e suporte vital. (Grupo de cabeça e pescoço, 2012)

#### Critérios de irressecabilidade

Presença de invasão vascular (TC, RM)

Invasão da fáscia pré-vertebral (fixação do tumor à musculatura pré vertebral)

Invasão mediastínica (infiltração da gordura mediastínica, vasos supra-aórticos, infiltração da traqueia ou esófago)

Tumores T4b da cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe

Previsão de impossibilidade de exérese completa com margens adequadas pela equipa cirúrgica; mutilação importante.

N2 com adenopatias fixas a estruturas vasculares e nervosas

N2 bilateral extensor

N3

Tumores “inoperáveis” também são os tumores com baixa taxa de sucesso cirúrgico, sequelas funcionais e/ou estéticas não aceitáveis pelo doente e/ou contraindicação médica para cirurgia.

Tabela 7: Critérios de irressecabilidade. (Grupo de cabeça e pescoço, 2012)

Cerca de 60% dos pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço têm doença localmente avançada, para a qual a modalidade de tratamento combinado com intenção curativa é recomendada. (Galbiatti *et al.*, 2013)

Apesar da obtenção de margens livres ser o objetivo primário da cirurgia de cabeça e pescoço, a realização de tal meta pode ser impossível em alguns casos devido à infiltração de estruturas vitais como a artéria carótida ou fâscias pré-vertebrais. Margens cirúrgicas comprometidas são associadas a redução da sobrevida. Pacientes nessa situação devem realizar novamente cirurgia para a remoção completa do tumor. Contudo, a obtenção de margens negativas pode levar a importantes disfunções em áreas como mastigação, deglutição e fala, afetando adversamente a qualidade de vida do paciente. (Galbiatti *et al.*, 2013)

Quando radioterapia é utilizada isoladamente, hiperfracionamento leva a melhoras significativas na sobrevida geral. A radioterapia acelerada sozinha, especialmente quando administrada em cronograma fracionado ou tratamentos extremamente acelerados com dose total reduzida, não aumenta a sobrevida geral. (Galbiatti *et al.*, 2013)

Em relação ao tratamento quimioterápico, a Cisplatina ainda é a base para o tratamento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço recorrente e metastático. Além disso, a administração de cisplatina em alta dose no pós-operatório concomitante à radioterapia é mais eficaz do que radioterapia isolada em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço localmente avançado, e sem causar um grande número de complicações tardias. (Galbiatti *et al.*, 2013)

#### 3.9.5.1. Resposta ao tratamento e prognóstico

Os dados sobre os vários estudos publicados que estratificam pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço por infecção do HPV são resumidos na Tabela 8.

Pacientes com tumores HPV-positivos tiveram uma redução de até 60-80% no risco de morte por cancro em comparação com os seus homólogos HPV-negativos. Esta diferença foi impulsionada por uma redução significativa do risco de morte por cancro em pacientes com cancro da orofaringe HPV-positivos. (Vu, Sikora, Fu, & Kao, 2010) Mesmo apresentando afetação linfática avançada, sobrevivência é maior em pacientes com carcinoma espinocelular orofaríngeo HPV-positivos em comparação com pacientes

com carcinoma espinocelular orofaríngeo HPV -negativos. (Pannone et al., 2012) Como seria de esperar, como consequência do aumento da incidência do carcinoma espinocelular orofaríngeo relacionadas com HPV, esta vantagem de sobrevivência resultou em melhorias dramáticas nas taxas de sobrevivência em 5 anos para pacientes com carcinoma espinocelular orofaríngeo e fizeram a transição do carcinoma espinocelular orofaríngeo como um dos diagnósticos mais graves de carcinomas do trato aerodigestivo superior para um dos melhores. (Pytynia *et al.*, 2014)

	Tumores HPV positivos (%)	Tumores HPV negativos (%)
Resposta à QT de indução	82* (n = 38)	55 (n = 58)
Resposta à quimiorradiação	84* (n = 38)	57 (n = 58)
Sobrevivência a 5 anos sem doença específica ( <i>disease-specific survival</i> )	88* (n = 62)	65 (n = 191)
Sobrevivência a 5 anos livre de doença	73* (n = 117)	41 (n = 381)
Controlo da doença locoregional a 5 anos	80* (n = 32)	42 (n = 174)
Sobrevivência geral a 5 anos	71* (n = 179)	40 (n = 572)

\* p < 0.05.

Tabela 8: Diferença de resultados clínicos entre os tumores HPV-positivo e HPV- negativos. (adaptação de Vu, Sikora, Fu, & Kao, 2010)

O mecanismo exato por trás da sobrevivência melhorada não é claro, mas três mecanismos têm sido propostos: reduzido campo de cancerização, melhora da capacidade de resposta à radiação e resposta imune aos antígenos virais. Pacientes HPV-positivos são menos associados à exposição ao álcool e tabaco, resultando num menor risco de carcinogénese e risco de morte para tumores aerodigestivos. (Vu *et al.*, 2010)

Num estudo descobriu-se que os pacientes com tumores da orofaringe que eram HPV-positivos com sobre expressão de p16 e p53 e expressão diminuída pRb tiveram uma sobrevida livre de doença significativamente maior de 5 anos e sobrevida global maior que os pacientes que tinham tumores da orofaringe HPV-negativos ou que não expressam p16. O resultado mais favorável para pacientes HPV-positivos foi acompanhado por maiores taxas de resposta à quimioterapia de indução (82% vs 55%) e quimioirradiação (84% vs 57%) em comparação com pacientes HPV- negativos (tabela 8). A sobrevivência global de dois anos foi de 95% vs 62% em pacientes HPV-positivos e HPV-negativos, respetivamente, resultando numa morte significativamente reduzida por qualquer causa. (Vu *et al.*, 2010)

Também o risco de tumores malignos secundários, será menor, devido à natureza focal da infeção pelo HPV, HPV-positivos não-fumadores. No entanto, um segundo cancro ocorre numa taxa de 2-3% por ano para o cancro espinocelular de cabeça e pescoço clássico. Assim, esta característica não resulta numa separação dramática nas curvas de sobrevida entre os pacientes HPV-positivos e HPV-negativos a longo prazo. (Vu *et al.*, 2010)

A mortalidade e morbidade associadas à doença maligna permanecem elevadas, causando impacto sobre a qualidade de vida e o custo de tratamento dos pacientes. O carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço pode afetar a saúde geral e mental, a aparência, emprego, vida social e vida familiar. Também podem ocorrer mudanças serias no funcionamento do trato aerodigestivo superior com consequentes impactos sobre a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, o entendimento do desenvolvimento da doença e a sua aparência podem ajudar na escolha do tratamento, assim como na análise dos sintomas e/ou reabilitação necessária, melhor organização e

qualidade do cuidado médico, identificando aspetos de impacto sobre a sobrevivência do paciente para ajudar na decisão da eficácia do tratamento por meio do esclarecimento dos efeitos colaterais do mesmo. (Galbiatti *et al.*, 2013)

A expectativa de vida por cinco anos é de 50% quando metástases linfonodais estão presentes. (Galbiatti *et al.*, 2013)

### **3.9.6. HPV e a radiosensibilidade**

Em contraste com a maioria dos tumores sólidos, as doenças malignas induzidas por vírus na região anogenital e faringe parecem ser mais sensíveis à terapia. (Vu *et al.*, 2010)

A administração de radiação parece aumentar a resposta imune contra antígenos virais. Um estudo que propõe esta hipótese sugere que existe melhor prognóstico em cânceros com HPV-16 contendo altas cargas virais. Um aumento do número de linfócitos CD3+ (*cluster of differentiation 3*) no tumor foram associados a uma menor incidência de metástases nos nódulos linfáticos em tumores HPV-positivos e melhora da sobrevivência, com significância estatística. Na era moderna da quimio-irradiação e da terapia de radiação com intensidade modulada para o cancro da orofaringe, a falha do tratamento a nível local ou regional é incomum (<15%). O padrão mais comum de falha atualmente é a recorrência à distância, que ocorre em aproximadamente 20% dos pacientes. Outros cânceros relacionados com infeção vírica, como o cancro da nasofaringe parece ter uma história natural semelhante quando tratados com quimio-irradiação. Também no caso do cancro da nasofaringe relacionado com Epstein Barr (OMS tipos 2 e 3) é considerado mais radiosensível do que suas contrapartes não-induzidas por vírus (OMS tipo 1) e onde a combinação de radioterapia de intensidade modulada e quimioterapia atinge um controlo loco-regional de mais de 90%, com mais insucesso nas metástases à distância. (Vu *et al.*, 2010)

Embora seja difícil generalizar entre os tipos de tumores, devido às diferenças específicas do local de tratamento e biologia subjacente, a radiação é geralmente utilizada em locais que, ou não são passíveis de cirurgia ou possam resultar em toxicidade inaceitável do tecido normal. Com exceção do cancro da próstata, que exige doses muito altas de radiação para tratar a doença que normalmente não é detetável por imagem ou exame físico, a radiação definitiva de cânceros induzidos não-virais volumosos (esófago, pulmão, laringe) é apenas moderadamente eficaz. O controlo da

doença a nível loco-regional com quimioirradiação primário é de 50% ou menos para tumores induzidos por vírus não- originários do cérebro, seios paranasais, esófago, pulmão, pâncreas e reto. Para a maior parte dos tumores sólidos comuns, incluindo carcinomas do pulmão, mama, bexiga e colo-rectal, a cirurgia é considerada o pilar do tratamento com intenção curativa, devido à relativa ineficácia da terapia não cirúrgica. Em contraste, os cancros do colo do útero e anal relacionados com o HPV estavam entre os primeiros tumores sólidos tratados com sucesso, através de terapia não cirúrgica e conservação do órgão. (Vu *et al.*, 2010)

Embora a dose de radiação que chega a estes sítios é tecnicamente abaixo do ideal (braquiterapia do cancro cervical é ainda realizada sem o conhecimento de distribuição da dose tridimensional e as doses de radiação para o cancro anal são normalmente limitados a <60 Gy), eles são razoavelmente eficazes. Com técnicas de radiação e quimioterapia modernas, o cancro da nasofaringe e orofaringe são controlados com IMRT e quimioterapia concomitante com taxas de sucesso bastante promissoras. Estes dados são consistentes com a noção de que os tumores malignos associados a infeções virais tendem a responder bem à radiação. (Vu *et al.*, 2010)

A radioterapia pode melhorar a resposta imunitária aos tumores HPV-positivos por diversos de mecanismos. Numerosos estudos in vivo demonstraram que RT dirigida ao tumor aumenta a eficácia de diferentes formas de terapias de base imune, incluindo vacinas de células dendríticas com antigénios associados ao tumor, a terapia de genes virais baseados em citocinas, e a transferência adotiva de células T citotóxicas. Possíveis mecanismos subjacentes com capacidade imunológica de reforço de RT incluem: (1) aumento da absorção de células mortas contendo antigénio morto por radiação; (2) a liberação de um grupo com alta mobilidade box1 (HMGB1) pelas irradiação das células tumorais a morrer que desencadeia recetor *toll-like 4* (TLR4) por via das células dendríticas ; (3) alterações pós-irradiação no microambiente tumoral e expressão de moléculas de adesão celular e maior penetrabilidade por células do sistema imunológico; (4) a normalização da vasculatura tumoral que aumenta de células T citolíticas e a migração de células dendríticas para o leito do tumor; (5) a supressão de sinais inibitórios pelas células T reguladoras (Treg) e células mielóides imaturas; (6) a segmentação de tumores Proangiogenic associados a macrófagos ; (7) RT induz citocinas pró – inflamatórias, incluindo o TNF- $\alpha$  e TNF membros da família de recetores, tais como Fas (membro da família de recetores ao fator de necrose tumoral

(TNF)), que podem inverter o microambiente tolerogénico e (8), supra-regulação induzida por radiação do complexo principal de histocompatibilidade de moléculas de classe I (MHC). Estas células dendríticas ativadas podem aumentar a apresentação de antígenos associados ao tumor e cativar as células T específicas do tumor para erradicar tumores residuais. O microambiente do tumor, incluindo células do sistema imunológico, pode contribuir para a maior radiosensibilidade observada clinicamente, mesmo quando a prova da radiosensibilidade celular inerente permanece elusiva. (Vu *et al.*, 2010)

Os dados experimentais sugerem que as células de cancro cervical HPV-positivo retêm a capacidade de sofrer apoptose após stress genotóxico. (Vu *et al.*, 2010)

Mutações em p53 foram recentemente demonstradas estarem correlacionadas com a taxa de sobrevivência, embora muito mais fraca do que o estado de HPV. A correlação entre a mutação de p53 e a radiosensibilidade é fraca. (Vu *et al.*, 2010)

Recentemente, uma correlação inversa entre o HPV-positivo e expressão de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) tem sido relatada. Apesar da sobre expressão de EGFR estar geralmente associada a um pior prognóstico em alguns estudos, após a exposição à radiação, praticamente todas as células do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço sobre expressaram dito fator após serem irradiadas.

Visto que os tumores HPV-positivos respondem claramente melhor à radioterapia, uma melhor exploração dos determinantes moleculares específicos de radiosensibilidade nos ditos tumores deverá ser investigada. (Vu *et al.*, 2010)

### **3.10. O VÍRUS DA IMUNODEFIÊNCIA HUMANA (HIV) E AS INFECÇÕES PELO PAPILOMAVÍRUS HUMANO**

A imunossupressão resultante da infeção por HIV está associada a um aumento da suscetibilidade à infeção por muitos outros agentes microbianos. O risco de infeção genital por HPV é particularmente alto para os indivíduos infectos por HIV porque a infeção dos dois vírus é frequentemente transmitida por via sexual. E sabe-se que um individuo exposto a um agente transmitido sexualmente tem um risco elevado de se expor a outros agentes transmitidos sexualmente. Portanto, indivíduos com um risco elevado de exposição ao HIV tendem a ter um risco mais alto para exposição a uma

infecção genital por HPV; a infecção é mais provável de persistir, é mais provável de resultar em anormalidades citológicas e de ter um risco muito superior de ter displasia de alto grau. Num estudo prospetivo de mulheres de elevado risco de nova Iorque, os esfregaços iniciais tirados detetaram aproximadamente o dobro de DNA de HPV em mulheres HPV positivas comparado com as mulheres HPV-negativas (56% vs 31%), e a infecção persistente foi seis vezes mais frequente em mulheres HPV-positivas em relação as mulheres HPV-negativas (24% vs 4%). As displasias de baixo grau foram três vezes mais frequentes em mulheres HPV-positivas (13% vs 4%), enquanto as displasias de elevado grau foram sete vezes mais frequentes (7% vs 1%). Um baixo número de CD4 em mulheres HPV positivas representa um fator de risco independente. (Knipe, 2013)

Consistente com os resultados cervicais, estudos retrospectivos de Nova Iorque reportaram que uma proporção alta inesperada de cancros cervicais diagnosticados em mulheres com menos de 50 anos de idade foram HIV positivos, levando o Centro de controlo e prevenção de doenças em 1993 a designar o cancro do colo do útero como uma doença que define a SIDA. Análise com amplos coortes confirmaram que a infecção de HIV coloca as mulheres com um risco elevado de desenvolverem cancro do colo do útero. O HIV representa um fator de risco para outras malignidades associadas à infecção por HPV, incluindo o cancro da vulva, pénis e ânus. Os tipos de HPV com potencial maligno limitado numa população HIV negativo podem estar associados a tumores agressivos em pacientes HIV positivos. (Knipe, 2013)

A relação inversa entre níveis de CD4 e o risco de infecção por HPV e displasia contrasta com a falta de associação entre o risco de cancro invasivo e os baixos níveis de CD4. A terapia anti retroviral altamente ativa também foi associada a uma redução modesta de displasia associada ao HPV e à não redução dos cancros associados ao HPV. Estas observações contrastam com a redução de incidência de lesões relacionadas com vírus (por exemplo: o Sarcoma Kaposi relacionada com herpes vírus) em doentes com tratamento anti retroviral altamente ativo. (Knipe, 2013)

A cavidade oral também pode servir como reservatório subclínico de HPV em jovens adultos que têm infecção por HIV. (Fatahzadeh et al., 2013)

Também vários estudos transversais têm vindo a observar que os indivíduos infetados pelo HIV têm uma probabilidade 2-3 vezes mais elevada de serem infetados por HPV oral em comparação com indivíduos não infetados pelo HIV, mesmo após o ajuste do

comportamento sexual e outros fatores relevantes. (Fatahzadeh et al., 2013) Estudos recentes sugerem que indivíduos infetados pelo HIV têm uma prevalência de DNA de HPV oral entre 20% e 45% (no género alfa), e uma prevalência oncogénica de DNA de HPV oral entre 12% e 26%. (Beachler & D'Souza, 2013)

Os estudos demonstram ainda que indivíduos infetados por HIV são mais propensos a serem infetados por génotipos de HPV de alto risco na sua mucosa oral. (Fatahzadeh *et al.*, 2013)

Estudos preliminares sugerem que semelhante ao HPV anogenital, haverá uma proporção substancial de infeções de HPV orais claras dentro de um ou dois anos. De facto, no HPV oral tem sido observado que se consegue eliminar mais rápido do que o HPV anal, provavelmente devido a diferenças de imunidade da mucosa nos locais anatómicos diferentes. Na infeção por HPV oral também tem sido constatado ser intermitente entre indivíduos infetados pelo HIV que estão recentemente sexualmente abstinente sugerindo que o HPV oral pode ter uma expressão ou re-expressão variável de um estado latente semelhante ao HPV anogenital. (Beachler & D'Souza, 2013)

### **3.10.1. Futura direção do tratamento**

Em ensaios clínicos futuros, os investigadores vão sentir a necessidade de estratificar o estatuto de HPV. Existe a oportunidade agora para investigar as estratégias de tratamento menos intensas que não comprometam os resultados de sobrevivência, mas reduzir o risco de efeitos debilitantes mais tarde. A maioria dos pacientes com cancro da orofaringe HPV-positivos são jovens e saudáveis. Assim, o fornecimento de um alto nível de qualidade de vida e menor número de complicações do tratamento são considerações importantes. Os efeitos secundários a longo prazo da quimioirradiação incluem disfagia, xerostomia, a dependência alimentar de um tubo e cicatrizes dos músculos da faringe, aspiração crónica e fadiga crónica. (Marur *et al.*, 2010)

ECOG (*Eastern Cooperative Oncology Group*) e a *Radiation Therapy Oncology Group* planearam um estudo com o objetivo de utilizar uma menor dose de radiação para controlo da doença e para investigar efeitos tóxicos e a qualidade de vida dos pacientes. (Marur *et al.*, 2010)

### **3.10.2. Estratégias de prevenção em países desenvolvidos e em desenvolvimento**

Nos países desenvolvidos, devido aos programas de diagnóstico precoce e tratamento adequado para o cancro do colo do útero inicial, observou-se nos últimos 20 anos uma acentuada redução (superior a 50%) da mortalidade por causa específica. (Katherine *et al.*, 2009)

A vacinação profilática deveria reduzir substancialmente o HPV associado a morbidade e a mortalidade, contudo atualmente continua a ser demasiado caro para a introdução em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. A realidade é que o cancro do colo do útero é apontado como uma das principais causas de morbilidade em mulheres. (Katherine *et al.*, 2009)

Ruanda tornou-se, recentemente, o primeiro país africano a introduzir um programa de prevenção nacional, que inclui a vacinação contra o HPV e testes. Isto foi tornado possível por doações da vacina e de testes HPV por parte dos fabricantes. Se uma boa vacina e uma boa triagem são possíveis neste cenário, então servirá como um modelo útil para outras partes da África Subsaariana. No entanto, a menos que outros mecanismos de financiamento se tornassem disponíveis, pode demorar muitos anos até que estas estratégias de prevenção semelhantes sejam introduzidas noutros países que poderiam beneficiar mais. (Tota *et al.*, 2011)

Em países com mais recursos, já existem programas de rastreio do cancro do colo do útero bem sucedidos, estando prevista a adição de programas de vacinação para ter um maior impacto. O teste Papanicolau atualmente lidera a deteção e tratamento de um grande número de lesões cervicais de baixo e alto grau, especialmente em mulheres jovens, para quem o tratamento ablativo carrega risco substancial de resultados reprodutivos adversos, incluindo parto prematuro e aborto espontâneo. A vacinação profilática das mulheres antes da sua iniciação sexual preveniria um grande número dessas lesões pré-cancerígenas, cancro de colo do útero, e alguns outros tipos de cancro relacionados com o HPV não- cervicais. A Austrália tornou-se recentemente o primeiro país a assistir a uma redução significativa na taxa de lesões cervicais de alto grau após a implementação da vacinação contra o HPV. No entanto, essa redução pode ser simplesmente um reflexo do menor controlo entre jovens mulheres vacinadas. Estudos futuros que envolvam ligações entre os registos, espera-se que forneçam uma melhor

estimativa dos benefícios da vacinação. A Austrália é também um dos poucos países com um programa de recuperação baseado na comunidade voltada para mulheres até 26 anos de idade para a vacinação. A maioria dos outros programas do governo são dirigidas exclusivamente à população feminina com 12 anos de idade naquele momento, e nesses ambientes é esperado para ter um tempo maior antes que haja um declínio visível de alterações do colo do útero e câncros relacionados com o HPV. (Tota *et al.*, 2011)

Na era pós-vacinação, o teste de DNA do HPV também servirá como segunda intenção para uma vigilância de baixo custo para monitorizar a eficácia da vacina, a duração proteção e proteção cruzada ou o tipo de substituição. A integração de estratégias de prevenção primárias e secundárias do cancro do colo do útero através de ligação e partilha de recursos é tratado como a melhor estratégia de prevenção. A ligação dos registos também fornece os dados necessários para avaliar o sucesso de estratégias de prevenção e para informar as políticas internacionais, com esperança de colocar pressão sobre os países com elevado poder, organizações não-governamentais, empresas farmacêuticas e outros doadores a prestar o seu apoio. (Tota *et al.*, 2011)

### **3.11. VACINAÇÃO**

Em geral, ao longo dos anos, as pessoas aumentaram o seu conhecimento geral e são mais recetivos para a vacinação contra o HPV. (D’Hauwers, Gadet, Donders, & Tjalma, 2013) Contudo, em Portugal há incidência mais alta de cancro cervical comparativamente aos outros países da união europeia. Recentemente, o ministério da saúde português proferiu que 80% das adolescentes com 15 anos já estão vacinadas. Contudo a vontade das pessoas para serem vacinadas depende de vários fatores incluindo os conhecimentos e as crenças da população acerca do HPV e do cancro cervical e do tipo de educação sobre a saúde é realizada pelos profissionais de saúde. (Medeiros & Ramada, 2010) As principais razões para as pessoas que recusam a vacinação é porque estes acreditam que não correm o risco de infeção pelo HPV ou por duvidarem da segurança das vacinas. Para aumentar a participação, a informação deve ser adaptada a cada subgrupo de pessoas, incluindo profissionais de saúde. (D’Hauwers *et al.*, 2013)

Existem dois tipos de vacinas contra o Papilomavírus humano em desenvolvimento: a vacina profilática e a vacina terapêutica. A vacina profilática estimula o desenvolvimento da resposta imunológica humoral, a qual ocorre após o contacto com as “partículas semelhantes a vírus” ou *virus like-particles* (VLP), que são estruturadas em forma de vírus sem conter DNA viral. Tal facto justifica a sua maior efetividade em pacientes que nunca entraram em contacto com o papiloma vírus. A presença de VLP estimula a produção de anti-corpos, que serão libertados pela mucosa genital com o objetivo de combater precocemente o HPV, evitando o quadro infeccioso. (Katherine *et al.*, 2009)

Já a vacina terapêutica estimula o desenvolvimento da resposta imune celular, ao sensibilizar células imunocompetentes para atuar no combate à infeção viral. Ou seja, as vacinas terapêuticas visam erradicar ou reduzir as células infetadas pelo HPV. Uma vez que a infeção pelo HPV já se tenha estabelecido, os anticorpos terão pouca participação na erradicação das células infetadas. São confeccionadas a partir de peptídeos, proteínas recombinantes, DNA de plasmídeos ou células dendríticas. Os *trials* das vacinas terapêuticas encontram-se em fase 1 e 2 de investigação, sendo os relatos de eficácia ainda não muito animadores para uso como terapêutica primária e com dados que diferem bastante em função das características da população estudada.(Katherine *et al.*, 2009) . Os linfócitos T citotóxicos (LTC) são os responsáveis primários da rejeição tumoral. Há muitas estratégias para estimular a produção dos LTC envolvendo as células que apresentam antígenos. Como a expressão das oncoproteínas E6 e E7 está associada aos casos de tumores, muitos esforços têm sido feitos para estimular os LTC contra E6 e E7. O estímulo dos LTC contra o capsídeo viral pode ter um papel na redução da extensão da infeção, mas não seria efetivo na redução das células neoplásicas. Para aumentar a imunogenicidade da proteína E7, um estudo fundiu a proteína E7 à *heat shock proteína 65* da vacina BCG. Esta fusão tem sido usada para imunizar homens com lesão de alto grau anal e verrugas anogenitais. Num estudo realizado com 14 pacientes com verrugas, três tiveram completa resolução e dez tiveram redução no tamanho da lesão em 70%-95%. Houve uma redução das lesões de baixo grau em 95% dos homens, com 44% para remissão completa. Os melhores resultados para a vacina terapêutica em humanos têm sido obtidos usando vetores virais vivos, tais como um adenovírus para apresentar antígenos. As estratégias para vacina terapêutica

estão a mudar rapidamente com o entendimento do mecanismo necessário para estimular a imunidade inata e adaptativa. (Giraldo *et al.*, 2008)

Vacinas profiláticas contra o HPV foram projetadas e produzidas principalmente para prevenir a infeção contra os tipos de HPVs de alto risco, HPVs 16 e 18, que causam cerca de 70% dos casos de cancro do colo do útero. Devido à crescente ligação entre o carcinoma espinocelular oral e os tipos de HPV 16 e 18, pesquisas feitas puseram em hipótese que o uso das duas vacinas disponíveis poderia causar a redução do crescimento da incidência do carcinoma orofaríngeo. (Daley *et al.*, 2014) Desde 2008, duas vacinas contra o HPV 16 e 18 estão comercialmente disponíveis. Uma vacina bivalente contra os vírus 16 e 18 (Cervarix®). A vacina tetravalente projetada para proteger contra os tipos de HPVs de baixo risco, os tipos 6 e 11, e os de alto risco, os tipos 16 e 18 (Gardasil®). (Katherine *et al.*, 2009). Os tipos de HPV 6 e 11 juntos causam 90% das verrugas genitais. As duas vacinas protegem contra os tipos de HPV 16 e 18, que representam 90 a 95% dos cancros orofaríngeos relacionados com o HPV. (Daley *et al.*, 2014)

Ao estudar-se a vacinação profilática chegou-se à conclusão que a vacinação isoladamente não é capaz de eliminar o cancro do colo uterino. É de salientar que a oportunidade de diagnóstico precoce de outras doenças sexualmente transmissíveis (DST) deve ser sempre considerada quando se trata da prevenção do colo uterino, com ou sem vacinação. Nenhuma vacina profilática se mostrou tão efetiva em pacientes que já tinham lesão. (Vargas & Suzuki, 2010) Por outro lado, a inserção de testes moleculares prévios à realização da vacina representaria um aumento importante nos custos e provavelmente outros entraves à vacinação em massa, reduzindo a sua efetividade. (Katherine *et al.*, 2009)

A vacina profilática contra o HPV tem elevada eficácia avaliada num curto período de tempo, quando comparada à evolução natural da infeção. Um período mais longo de observação é necessário para uma estimativa mais próxima do impacto da vacinação na redução do cancro do colo uterino. (Katherine *et al.*, 2009)

### **3.11.1. Vacina Bivalente**

A Cervarix™, desenvolvida por GlaxoSmithKline Biologicals, em Rixensart na Bélgica, é uma vacina bivalente HPV-16/18 VLP L1. (Herrero *et al.*, 2013) A proteína L1 de cada tipo de HPV é expressa pelo vector recombinante de baculovírus, e os VLPs

são gerados separadamente e depois combinados. A Cervarix™ consiste na purificação dos VLPs L1 dos tipos de HPV16/18 com 20/20 µm/dose, respectivamente, formulado com um adjuvante ASO4 constituído por hidróxido de alumínio 500 µg e 3-desacilado lípido monofosforil A administração é feita via intramuscular a 0,5 ml em três doses com um protocolo aos 0, 1 e 6 meses. (Stanley, 2007)



Figura 30: Embalagem da vacina cervarix. (“Vaccine resistance movement,” 2011)

### 3.11.2. Vacina tetravalente

A Gardasil®, foi desenvolvida pela Meck & Co.Ink. contra os tipos de HPV 16/18/6/11. (Herrero et al., 2013) Por cada HPV VLP a proteína L1 é expressada por um vector recombinante *saccharomyces pombe*. A vacina é composta por VLP L1 purificados dos tipos de HPV 6/11/16/18 numa concentração 20/40/20/dose, respectivamente, formulados com um adjuvante proprietário. A Gardasil® está disponível com uma injeção intramuscular a 0,5 ml administrados em três doses com um protocolo de 0, 2 e 6 meses. (Stanley, 2007)

Ambas as vacinas são seguras e bem toleradas, e bastante imunogénicas (100 %) contra a infeção dos tipos de HPVs incluídos na vacina. A eficácia da vacina em mulheres HPV-negativos é muito elevada (>90 %) para ambas as vacinas na prevenção de uma futura infeção genital persistente com os tipos de HPV incluídos na vacina e doenças relacionadas. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014)

Ambas as vacinas contra a infeção por HPV, a bivalente ou a tetravalente, protegem as mulheres que tiveram no passado infeção por HPV dos tipos que as vacinas englobam. (Monsonogo et al., 2012)

A vacinação está indicada para mulheres entre os 9 e 26 anos e devem de ser administradas em três doses via intramuscular. (Katherine *et al.*, 2009)



Figura 31: Embalagem da vacina Gardasil. (“Biospectrum,” 2012)

### 3.11.3. Vacinação nos jovens rapazes e homens

Em 2006, *the Advisory Committee on Immunization Practices* recomendou a vacina contra o HPV para a prevenção do cancro do colo do útero e das verrugas genitais entre as mulheres com idades entre os 9-26 anos; em 2011, as recomendações foram estendidas para a prevenção do cancro anal entre os homens com idades entre os 11 e 26 anos. (Daley *et al.*, 2014) Os Estados Unidos da América, Austrália e Canadá foram os primeiros países que recomendaram e iniciaram uma rotina de vacinação entre rapazes. (Tisi *et al.*, 2013) Visto que a vacinação é tão eficiente na prevenção da infeção por alguns tipos de HPV nas mulheres, será provavelmente efetiva em rapazes e homens; então quais os benefícios da vacinação em rapazes e homens? Os benefícios desta vacinação podem ser divididos em duas categorias: redução das doenças associadas ao HPV em rapazes e homens e prevenção da transmissão do vírus HPV às mulheres. (Palefsky, 2010)

Um estudo recente indica que a vacinação de rapazes de 12 anos de idade com a vacina tetravalente não seria rentável. No entanto, este estudo assume que 75% das mulheres elegíveis seriam vacinadas, um valor que é substancialmente mais elevado do que as atuais taxas de cobertura vacinal nos Estados Unidos. Sem dúvida, os estudos futuros vão estimar com mais precisão o custo-benefício da vacinação masculina de novo. (Palefsky, 2010) O programa nacional de base populacional de vacinação contra o HPV

em mulheres com a vacina tetravalente demonstrou na Austrália uma redução significativa das verrugas genitais em homens jovens heterossexuais, mas não em adultos homossexuais. Isso pode ser explicado pela “imunidade de rebanho”; por outras palavras, a redução da ocorrência de infecções de HPV do tipo 6 e 11 e verrugas genitais nas jovens vacinadas contribui largamente para a redução da exposição a essas infecções em homens jovens. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014) O programa Nacional de Vacinação contra o HPV Australiano prevê que as taxas de infecção por HPV do tipo 16/18 nos homens (via transmissão heterossexual) reduza mais de dois terços até ao ano 2050. Estendendo-se o atual programa de vacinação incluindo os homens, irá fornecer benefícios. (Smith *et al.*, 2011)

#### **3.11.4. A vacinação e a medicina dentária**

À luz destes conhecimentos, ambas as vacinas de HPV podem ser úteis na prevenção de cancro também na boca e na orofaringe, porque são principalmente causados por HPV 16. O benefício da vacina tetravalente é a prevenção das doenças relacionadas com o HPV 6 e o HPV 11, tais como a papilomatose laríngea, o condiloma oral e o papiloma; no entanto, as atuais vacinas contra o HPV não protegem contra outros HPVs -  $\alpha$  e, particularmente, HPV - $\beta$  e as suas doenças associadas. (Grce & Mravak-Stipetić, 2014)

Enquanto os médicos administrarem principalmente vacinas contra o HPV, os médicos dentistas realizam os exames de rastreamento do cancro oral, inspecionando face, pescoço, lábios, gengivas, membranas e pavimento da boca, rebordo alveolar, palato duro e mole, e lesões da língua ou outros sinais de cancro. Além disso, os médicos dentistas estão entre os profissionais de saúde mais visitados pelos pacientes. Essa interação regular com pacientes oferece aos médicos dentistas uma oportunidade única de contribuir para a prevenção primária de cancro oral relacionados ao HPV, discutindo a vacina contra o HPV com seus pacientes. Esta é uma área promissora para aumentar a eficácia da vacina, como uma recente revisão sistemática da aceitabilidade da vacina contra o HPV, indicando o importante papel que os profissionais de saúde têm em aumentar a cobertura vacinal entre os seus pacientes. Além disso, a evidência dos médicos dentistas utiliza este papel preventivo como tem sido demonstrado na área da cessação tabágica. Além disso, a importância da prevenção primária e secundária para a saúde pública realizada por médicos dentistas tem sido observada no recém-

desenvolvido do *Healthy People 2020 Oral Health Objective*: "Aumentar a proporção de adultos que recebem intervenções preventivas em consultórios dentários ". Existirem prestadores de saúde oral nas atividades de prevenção relacionadas com o HPV pode ser uma estratégia significativa para reduzir a incidência de cancro relacionado ao HPV. (Daley *et al.*, 2014;Medeiros & Ramada, 2010)

Os dentistas procuram aprovação e orientação das suas organizações profissionais, como a ADA. A ADA pode, portanto, auxiliar na orientação dos médicos dentistas através da elaboração de diretrizes para discussões HPV-carcinoma espinocelular oral. Além disso, mudar a percepção da comunidade de médicos dentistas do seu "papel" como um profissionais de saúde é fundamental para se mudar o futuro. O que, no entanto, vai ser difícil de se conseguir, porque se requer uma "mudança cultural " ou mudança de paradigma para a profissão. A profissão de médico dentista revela-se determinate no esforço para reduzir os casos futuros de carcinoma espinocelular oral relacionados com HPV. É provável que o reconhecimento público desse papel ocorra antes da aceitação e da prontidão profissional. As organizações profissionais, como a ADA, tradicionalmente, forneceram à profissão informações e ferramentas para permitir o avanço nesse sentido. A profissão também pode beneficiar de uma formação complementar, por meio de actualizações continuadas e fortalecendo o conteúdo deste tema no currículo das escolas de medicina dentária. (Daley *et al.*, 2014)

Foram realizadas pesquisas, que revelaram que a maioria dos médicos dentistas não estão envolvidos neste comportamento de prevenção primária. Além disso, existem fatores que impedem a ação dos médicos dentistas em recomendar estas vacinas. As recomendações incluem a preparação dentistas para conversas confidenciais com os pacientes de ambos os sexos e maior envolvimento com a ADA na orientação profissional nesta área. Como a consciencialização pública dos cancros orofaríngeos associados ao HPV está a aumentar, prestadores de cuidados orais podem ser esperados para abordar o tema com seus os pacientes. (Daley *et al.*, 2014)

Contudo a pesquisa por novas vacinas não termina, investigadores australianos demonstraram também a criação e utilização de uma nova estratégia terapêutica de vacinação de DNA intra-dérmica utilizando plasmovírus como partículas que transportam a oncoproteína E7 (pVLPs- E7- um DNA de plasmídeo que é capaz de formar recombinante *retrovirus-based virus-like particles*) para cancros de cabeça e pescoço. A eficácia anti- tumoral de pVLPs -E7 foi comparado de acordo com a via de

administração a uma vacina. Especificamente, seguindo a via de administração na mucosa jugal e via intra-dérmica com pVLP -E7. Os dados demonstraram que a administração via intra-dérmica provocou uma resposta imune celular melhor sistêmica anti- E7 em comparação com a administração na mucosa jugal em ratos. A via de administração também foi capaz de induzir a imunidade humoral anti - E7-específico. Descobriu-se também que ratos portadores de tumores bem estabelecidos, a administração pela mucosa jugal induziu uma imunização com um melhor efeito terapêutico em comparação com a imunização via intra-dérmica. (Ranasinghe, 2014)

Os dados também mostraram que vacinação na mucosa jugal com pVLP -E7 especificamente com agonistas TLR (Imiquimod e CPG) têm um bom potencial como estratégia terapêutica para cânceres de cabeça e pescoço induzidas pelo HPV. (Ranasinghe, 2014)

### **3.11.5. Vacinação contra a infecção por HPV em Portugal**

Em outubro de 2008 a vacina tetravalente foi introduzida no Programa Nacional de Vacinação (PNV) para jovens com 13 anos de idade, nascidas a partir de 1995. De 2009 a 2011 decorreu uma campanha de vacinação das raparigas com 17 anos de idade (nascidas entre 1992 e 1994).

#### **Avaliação da vacinação contra o HPV no continente- 2013**

A vacinação contra HPV é avaliada, no âmbito da avaliação anual do PNV, pela percentagem de jovens vacinadas com 1, 2 e 3 doses nas coortes de nascimento alvo de vacinação de rotina (PNV) e da campanha.

## Vacinação no âmbito do PNV (desde 2008)

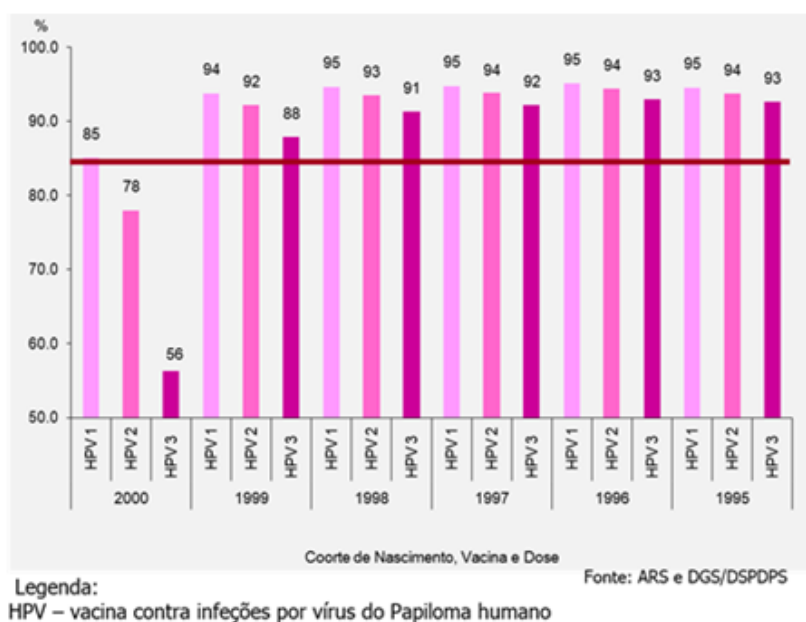


Gráfico 3: Cobertura vacinal por coorte e número de dose, no âmbito do PNV. Avaliação 2013, continente. (Leça, Ana; Calé, Etelvina; Castelão, Isabel; Valente, Paula; Fernandes, 2014)

O gráfico 3 apresenta as coberturas vacinais em 31 de dezembro de 2013 nas coortes vacinadas contra HPV, desde o ano de 2008 (nascidas entre 1995 e 2000).

As coberturas vacinais para 3 doses da vacina variaram entre 88% e 93% nas coortes nascidas entre 1995 e 1999.

A meta de 85% para as 3 doses foi atingida em todas as coortes, exceto na que iniciou a vacinação em 2013 já que cerca de metade destas jovens (nascidas a partir de 1 de julho de 2000) não teve tempo para terminar o esquema recomendado, sendo que 85% destas jovens já fizeram a 1ª dose.

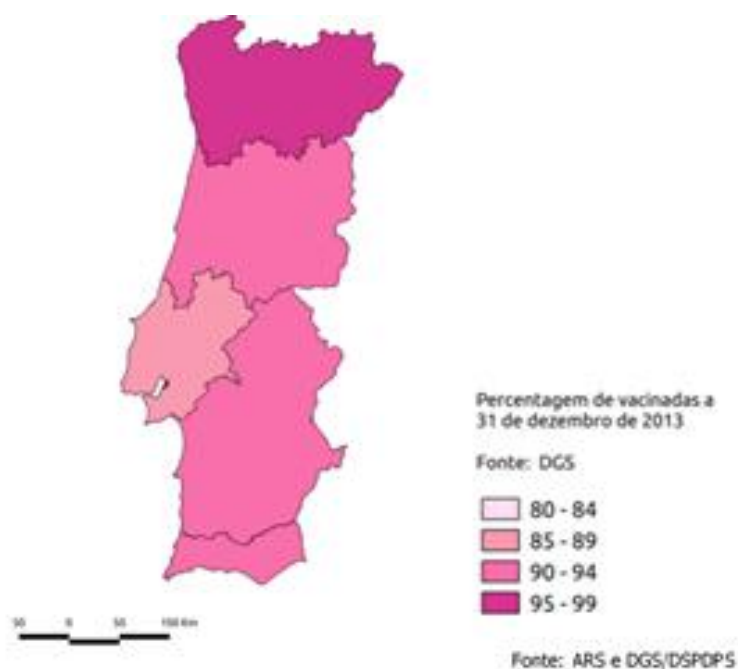


Figura 32: Cobertura vacinal para a 3ª dose da vacina HPV em jovens nascidas em 1995, por ARS. Avaliação 2013, Continente.

Na figura 32 apresentam-se as coberturas vacinais por Administração Regional de Saúde (ARS) na coorte de jovens nascidas em 1995.

Apesar de algumas diferenças regionais, todas as ARS apresentam valores superiores a 85% de cobertura para 3 doses da vacina na primeira coorte de jovens vacinadas por rotina (1995). (figura 32).

#### 3.11.5.1. Vacinação no âmbito da Campanha (anos de 2009 a 2011)

O gráfico 4 apresenta as coberturas vacinais para HPV nas coortes vacinadas na campanha (jovens nascidas em 1992, 1993 e 1994).

A meta de 85% de jovens vacinadas com 3 doses da vacina HPV foi atingida em todas as coortes vacinadas em campanha apesar de se tratar de jovens mais velhas ( $\geq 17$  anos de idade), geralmente com menor adesão à vacinação. (Leça, Ana; Calé, Etelvina; Castelão, Isabel; Valente, Paula; Fernandes, 2014)

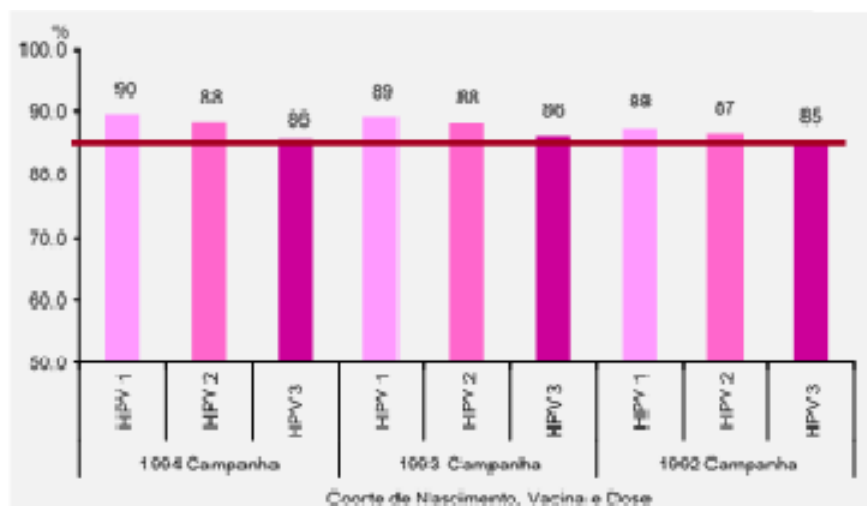


Gráfico 4: Cobertura vacinal por coorte e número de doses, no âmbito da Campanha (2009 a 2011). Avaliação 2013, continente.

Apesar de algumas diferenças regionais, todas as ARS apresentam valores superiores a 75% de cobertura para 3 doses da vacina na primeira coorte de jovens vacinadas em campanha (1992). (gráfico4). (Leça, Ana; Calé, Etelvina; Castelão, Isabel; Valente, Paula; Fernandes, 2014)

#### **4. CONCLUSÕES**

A cada ano que passa surgem mais genótipos de HPV identificados. Até à data foram identificados 40 tipos que infetam a mucosa oral e anogenital; e a tendência é continuar a aumentar esse número.

A incidência do HPV já passou por várias eras, sendo inicialmente mais ligada a fumadores e alcoólicos e atualmente também pode ser atribuída a jovens com comportamentos sexuais de risco (elevado número de parceiros sexuais, praticantes de sexo oral, início precoce de atividades sexuais).

É possível encontrar-se subtipos de HPV na mucosa oral, sendo os mais frequentes os HPV 16 e 18. Isto leva a crer que a presença de vírus de HPV não é suficiente para causar transformação maligna. Sendo necessários cofatores, como deficiências nutricionais, a ação hormonal, o alcoolismo, a predisposição genética e o compromisso do sistema imunitário. A combinação destes fatores pode levar a alterações celulares de lesões benignas com transformação maligna. A presença de HPV na mucosa oral normal pode também indicar que a mucosa oral pode atuar como reservatório para novas infeções ou como fator de recidiva.

A infeção por HPV tem um papel importantíssimo no desenvolvimento do carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço. Mas também está associado a comportamentos não tradicionais e fatores ambientais.

Os tumores HPV-positivos apresentam uma taxa de sobrevivência melhor que os HPV negativos. E a sobrevivência associada ao doentes HPV positivos é semelhante quer em doentes que tenham sido tratados com cirurgia ou com quimiorradiação. Isto sugere que a vantagem de sobrevivência se deve mais a fatores imunológicos do que a interações favoráveis entre o HPV e a quimiorradiação.

Os investigadores estimam que até 2020 a incidência de carcinoma espinocelular orofaríngeo HPV positivo será maior do que a incidência do colo do útero. Isto porque atualmente faz-se um rastreio mais apertado para os cancros do colo do útero e não se dá a devida importância aos rastreios do cancro oral. Não existe um teste específico para detetar o carcinoma espinocelular associado ao HPV a nível oral.

O programa de vacinação contra o vírus do HPV nas mulheres encontra-se numa fase bastante positiva, pois com recurso a programas de sensibilização e a inserção de vacinas contra o vírus HPV nos planos nacionais de vacinação, a população dos países desenvolvidos tem sido vacinada em grande massa. No entanto nos homens e rapazes não temos vindo a verificar isso, principalmente porque faltam estudos que confirmam a 100% que a vacinação será realmente eficaz na diminuição da incidência de lesões HPV positivas e por sua vez não tem sido feita a divulgação entre a população e os profissionais de saúde de diversas áreas, incluindo a medicina dentária. Assim os médicos dentistas têm um papel preventivo muito importante, pois são profissionais de saúde que contactam com os pacientes regularmente, possuindo por isso o dever de educar, alertar, executar rastreios e biopsias em lesões suspeitas. Associações como a ADA devem ajudar na orientação dos profissionais de saúde, elaborando diretrizes.

Atualmente a maioria dos médicos dentistas não estão envolvidos na prevenção primária. Contudo era benéfico, em todos os aspetos, aumentar a preparação dos médicos dentistas para uma atitude preventiva. A criação de um teste específico para detetar os tumores da cavidade oral associados ao HPV era ideal para que os diagnósticos sejam feitos mais facilmente, sem erros ou dúvidas.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Auluck, A., Hislop, G., Bajdik, C., Poh, C., Zhang, L., & Rosin, M. (2010). Trends in oropharyngeal and oral cavity cancer incidence of human papillomavirus (HPV)-related and HPV-unrelated sites in a multicultural population: the British Columbia experience. *Cancer*, *116*(11), 2635–2644. doi:10.1002/cncr.25087
- Beachler, D., & D'Souza, G. (2013). Oral HPV infection and head and neck cancers in HIV-infected individuals. *Current Opinion in Oncology*, *25*(5), 503–510. doi:10.1097/CCO.0b013e32836242b4.Oral
- Biospectrum. (2012). Disponível em [http://www.biospectrumasia.com/biospectrum/news/23348/chinese-firm-promote-msd-cancer-vaccine-gardasil#.U43x8ukU\\_Mq](http://www.biospectrumasia.com/biospectrum/news/23348/chinese-firm-promote-msd-cancer-vaccine-gardasil#.U43x8ukU_Mq), acessado em 30/05/2014
- Bottalico, D., Chen, Z., Dunne, A., Ostolozza, J., McKinney, S., Sun, C., ... Burk, R. D. (2011). The oral cavity contains abundant known and novel human papillomaviruses from the Betapapillomavirus and Gammapapillomavirus genera. *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(5), 787–92. doi:10.1093/infdis/jir383
- Castro, T. P. P. G., & Bussoloti Filho, I. (2006). Prevalência do papilomavírus humano (HPV) na cavidade oral e na orofaringe. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, *72*(2), 272–282. doi:10.1590/S0034-72992006000200021
- Cavenaghi, V. B., Ghosn, E. J. E., Cruz, N., Rossi, L. M., da Silva, L., Costa, H. O., & Villa, L. L. (2013). Determination of HPV prevalence in oral/oropharyngeal mucosa samples in a rural district of São Paulo. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, *79*(5), 599–602. doi:10.5935/1808-8694.20130107
- Colon-López, V., Quiñones-Avila, V., Del Toro-Mejías, L. M., Reyes, K., Rivera, M. E., Nieves, K., ... Ortiz, A. P. (2014). Oral HPV infection in a clinic-based sample of Hispanic men. *BMC Oral Health*, *14*, 7. doi:10.1186/1472-6831-14-7
- Contraboli. (2011). Disponível em, <http://www.contraboli.ro/cancer-cervical-de-col-uterin-semne-simptome-cauze-factori-de-risc/>, acessado a 11/6/2014
- D'Hauwers, K. W. M., Gadet, P. F. E., Donders, a R. T., & Tjalma, W. a a. (2013). Impact of medical education on knowledge and attitudes regarding the human papilloma virus and vaccination: comparison before and 6 years after the introduction of the vaccines. *Vaccine*, *31*(49), 5843–7. doi:10.1016/j.vaccine.2013.09.068
- Daley, E., Dodd, V., Debate, R., Vamos, C., Wheldon, C., Kline, N., ... Driscoll, a. (2014). Prevention of HPV-related oral cancer: assessing dentists' readiness. *Public Health*, *128*(3), 231–8. doi:10.1016/j.puhe.2013.12.002
- Danielewski, J. a, Garland, S. M., McCloskey, J., Hillman, R. J., & Tabrizi, S. N. (2013). Human papillomavirus type 6 and 11 genetic variants found in 71 oral and anogenital epithelial samples from Australia. *PLoS One*, *8*(5), e63892. doi:10.1371/journal.pone.0063892

- Dermis. (n.d.). Disponível em <http://www.dermis.net/dermisroot/pt/1196238/image.htm>, acessado a 9/6/2014
- Dutra, I., Santos, M. R., Soares, M., Couto, A. R., Bruges-armas, M., Teixeira, F., ... Bruges-armas, J. (2008). Azorean population , Terceira island , 5, 1–5. doi:10.1186/1750-9378-3-6
- Esteves, M. D. (2013). *Infecção de HPV E EBV em tumores de cabeça e pescoço*. Universidade de Aveiro.
- Estomatologia Online. (2012). Disponível em <http://estomatologiaonline.net/2012/07/11/hpv-prevencaodiagnostico-e-tratamento/> acessado a 3/6/ 2014
- Fatahzadeh, M., Schlecht, N., & Chen, Z. (2013). Oral human papillomavirus detection in older adults who have human immunodeficiency virus infection. *Oral Surgery, Oral ...*, (973). doi:10.1016/j.oooo.2012.11.004.Oral
- FDA. (2014). Disponível em <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm394773.htm>, 26/5/ 2014
- Franco, E. L., de Sanjosé, S., Broker, T. R., Stanley, M. a., Chevarie-Davis, M., Isidean, S. D., & Schiffman, M. (2012). Human papillomavirus and cancer prevention: Gaps in knowledge and prospects for research, policy, and advocacy. *Vaccine*, 30(SUPPL.5), F175–82. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.092
- Galbiatti, A. L. S., Padovani-Junior, J. A., Maníglia, J. V., Rodrigues, C. D. S., Pavarino, É. C., & Goloni-Bertollo, E. M. (2013). Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 79(2), 239–247. doi:10.5935/1808-8694.20130041
- García-Espinosa, B., Moro-Rodríguez, E., & Álvarez-Fernández, E. (2013). Human papillomavirus genotypes in human immunodeficiency virus-positive patients with anal pathology in Madrid, Spain. *Diagnostic Pathology*, 8, 204. doi:10.1186/1746-1596-8-204
- Genomica. (n.d.). Disponível em [http://www.genomica.es/en/in\\_vitro\\_diagnostics\\_products\\_clartr\\_stis.cfm](http://www.genomica.es/en/in_vitro_diagnostics_products_clartr_stis.cfm) , acessado a 7/5/2014
- Gillison, M. L. (2008). Human Papillomavirus-Related Diseases: Oropharynx Cancers and Potential Implications for Adolescent HPV Vaccination. *Journal of Adolescent Health*, 43(4 SUPPL.), S52–60. doi:10.1016/j.jadohealth.2008.07.002
- Girald, P. C., José, M., Silva, P. M. A., Fedrizzi, E. N., Gonçalves, A. K. S., Amaral, R. L. G., & Junior, J. E. (2008). P i hpv l a u v, 20(2), 132–140.
- Grece, M., & Mravak-Stipetić, M. (2014). Human papillomavirus-associated diseases. *Clinics in Dermatology*, 32(2), 253–8. doi:10.1016/j.clindermatol.2013.10.006

Grupo de cabeça e pescoço. (2012). *Protocolo de cabeça e pescoço do IPO*.

Herrero, R., Quint, W., Hildesheim, A., Gonzalez, P., Struijk, L., Katki, H. a, ... Kreimer, A. R. (2013). Reduced prevalence of oral human papillomavirus (HPV) 4 years after bivalent HPV vaccination in a randomized clinical trial in Costa Rica. *PloS One*, 8(7), e68329. doi:10.1371/journal.pone.0068329

Infestética. (n.d.). Disponível em <http://www.infoestetica.com/images/stories/dermatologia/eliminacion-de-fibromas-y-verrugas/aspecto-verruga-vulgar.jpg>, acessado a 9/6/ 2014

Jensen, K. E., Schmiedel, S., & Frederiksen, K. (2012). Risk for Cervical Intraepithelial Neoplasia Grade 3 or Worse in Relation to Smoking among Women with Persistent Human Papillomavirus Infection. doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-0663

Jin, L., Sturgis, E. M., Zhang, Y., Huang, Z., Song, X., Li, C., ... Li, G. (2013). Association of tumor necrosis factor-alpha promoter variants with risk of HPV-associated oral squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*, 12(1), 80. doi:10.1186/1476-4598-12-80

Katherine, A., Giraldo, P. C., Pontes, A. C., & Dantas, G. L. (2009). REVISÃO SISTEMATIZADA A eficácia da vacina profilática contra o HPV nas lesões HPV induzidas.

Knipe, D. M. . H. P. M. (2013). *FIELDS Virology*. In L. Williams (Ed.), (6ª edition ed.). Philadelphia.

Kostareli, E., Holzinger, D., Bogatyrova, O., Hielscher, T., Wichmann, G., Keck, M., ... Hess, J. (2013). HPV-related methylation signature predicts survival in oropharyngeal squamous cell carcinomas, 123(6). doi:10.1172/JCI67010.2488

Lauzurica. (n.d.). Disponível em <http://lauzurica.wordpress.com/tag/epidermodisplasia-verruciforme/>, acessado a 29/5/2014

Leça, Ana; Calé, Etelvina; Castelão, Isabel; Valente, Paula; Fernandes, T. (2014). A vacinação contra o vírus do papiloma humano ( HPV ). *Boletim Vacinação - Edição Especial*, pp. 1-4.

Machado, J., Reis, P. P., Zhang, T., Simpson, C., Xu, W., Perez-Ordóñez, B., ... Kamel-Reid, S. (2010). Low prevalence of human papillomavirus in oral cavity carcinomas. *Head & Neck Oncology*, 2, 6. doi:10.1186/1758-3284-2-6

Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H., & Forastiere, A. a. (2010). HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*, 11(8), 781-9. doi:10.1016/S1470-2045(10)70017-6

Medeiros, R., & Ramada, D. (2010). Knowledge differences between male and female university students about human papillomavirus (HPV) and cervical cancer: Implications for health strategies and vaccination. *Vaccine*, 29(2), 153-60. doi:10.1016/j.vaccine.2010.10.068

- Medina, M. L., Medina, M. G., & Merino, L. A. (n.d.). Consideraciones actuales sobre la presencia de papilomavirus humano en la cavidad oral Current considerations about the presence of the human papilomavirus in the oral cavity.
- Monsonogo, J., Zerat, L., Syrjänen, K., Zerat, J. C., Smith, J. S., & Halfon, P. (2012). Prevalence of type-specific human papillomavirus infection among women in France: Implications for screening, vaccination, and a future generation of multivalent HPV vaccines. *Vaccine*, *30*(35), 5215–5221. doi:10.1016/j.vaccine.2012.06.013
- Nelke, K. H., Łysenko, L., Leszczyszyn, J., & Gerber, H. (2013). Human papillomavirus and its influence on head and neck cancer predisposition Wirus brodawczaka ludzkiego i jego wpływ na predyspozycję do nowotworów głowy i szyi, 610–616.
- Palefsky, J. M. (2010). Human Papillomavirus-Related Disease in Men: Not Just a Women's Issue. *Journal of Adolescent Health*, *46*(4 SUPPL.), S12–9. doi:10.1016/j.jadohealth.2010.01.010
- Panatto, D., Amicizia, D., Trucchi, C., Casabona, F., Lai, P. L., Bonanni, P., ... Gasparini, R. (2012). Sexual behaviour and risk factors for the acquisition of human papillomavirus infections in young people in Italy: suggestions for future vaccination policies. *BMC Public Health*, *12*(1), 623.
- Pannone, G., Rodolico, V., Santoro, A., Lo Muzio, L., Franco, R., Botti, G., ... Bufo, P. (2012). Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infectious Agents and Cancer*, *7*(1), 4. doi:10.1186/1750-9378-7-4
- Pereira, G., Porro, A. M., Francisco, G., & Tomimori, J. (2011). biologia molecular e manifestações clínicas \* clinical manifestations, 306–317.
- Podologistas Elma Duarte. (n.d.). Disponível em <http://podologistaselmaduarte.blogspot.pt/2010/11/verruca-plantar.html> , aceso a 9/6/2014
- Pytynia, K. B., Dahlstrom, K. R., & Sturgis, E. M. (2014). Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, *50*(5), 380–386. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.12.019
- Quintero, K., Giraldo, G. A., Uribe, M. L., Baena, A., Lopez, C., Alvarez, E., & Sanchez, G. I. (2013). Human papillomavirus types in cases of squamous cell carcinoma of head and neck in Colombia, *79*(3), 375–381. doi:10.5935/1808-8694.20130065
- Ranasinghe, C. (2014). New advances in mucosal vaccination. *Immunology Letters*. doi:10.1016/j.imlet.2014.01.006
- Ronell, E. (2005). y su asociación con cáncer bucal, 147–154.

- Rovers Medical Devices. (n.d.). Disponível em, [http://www.roversmedicaldevices.com/index.php?pagina\\_id=53](http://www.roversmedicaldevices.com/index.php?pagina_id=53) , acessado a 3/6/2014
- Saúde. (n.d.). Disponível em <http://saude.umcomo.com.br/articulo/como-eliminar-uma-verruca-filiforme-2258.html>, acessado a 28/5/2014
- Smith, M. a., Lew, J. Bin, Walker, R. J., Brotherton, J. M. L., Nickson, C., & Canfell, K. (2011). The predicted impact of HPV vaccination on male infections and male HPV-related cancers in Australia. *Vaccine*, 29(48), 9112–9122. doi:10.1016/j.vaccine.2011.02.091
- Stanley, M. (2007). Prevention strategies against the human papillomavirus: the effectiveness of vaccination. *Gynecologic Oncology*, 107(2 Suppl 1), S19–23. doi:10.1016/j.ygyno.2007.07.068
- Tachezy, R., Smahelova, J., Kaspirkova, J., & Salakova, M. (2013). Human papillomavirus type-specific prevalence in the cervical cancer screening population of Czech women. *PloS One*, 8(11), e79156. doi:10.1371/journal.pone.0079156
- Termine, N., Giovannelli, L., Rodolico, V., Matranga, D., Pannone, G., & Campisi, G. (2012). Biopsy vs. brushing: Comparison of two sampling methods for the detection of HPV-DNA in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncology*, 48(9), 870–875. doi:10.1016/j.oraloncology.2012.03.002
- Tisi, G., Salinaro, F., Apostoli, P., Bassani, R., Bellicini, A., Groppi, L., ... Pecorelli, S. (2013). HPV vaccination acceptability in young boys, 49(3), 286–291. doi:10.4415/ANN
- Toque ginecológico. (2011). Disponível em <http://toqueginecologico.blogspot.pt/2011/06/hpv-pra-voce-entender.html> , acessado a 28/5/2014
- Tota, J. E., Chevarie-Davis, M., Richardson, L. a., DeVries, M., & Franco, E. L. (2011). Epidemiology and burden of HPV infection and related diseases: Implications for prevention strategies. *Preventive Medicine*, 53(SUPPL. 1), S12–21. doi:10.1016/j.ympmed.2011.08.017
- Vaccine resistance movement. (2011). 2011. Disponível em [https://www.google.pt/search?q=cervarix&newwindow=1&rls=com.microsoft:pt-PT:IE-Address&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ei=HPGNU4S-NebE0QWpzICwAw&ved=0CAgQ\\_AUoAQ&biw=1242&bih=612#facrc=\\_&imgdii=\\_&imgrc=BT5Et3iC5NXc3M%3A;Qc80NAE7RQUwxM;http%3A%2F%2Fvaccineresistancemovement.org%2Fwp-content%2Fuploads%2F2011%2F02%2FCervarix21.JPG;http%3A%2F%2Fvaccineresistancemovement.org%2F%3Fp%3D7579;581;326](https://www.google.pt/search?q=cervarix&newwindow=1&rls=com.microsoft:pt-PT:IE-Address&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ei=HPGNU4S-NebE0QWpzICwAw&ved=0CAgQ_AUoAQ&biw=1242&bih=612#facrc=_&imgdii=_&imgrc=BT5Et3iC5NXc3M%3A;Qc80NAE7RQUwxM;http%3A%2F%2Fvaccineresistancemovement.org%2Fwp-content%2Fuploads%2F2011%2F02%2FCervarix21.JPG;http%3A%2F%2Fvaccineresistancemovement.org%2F%3Fp%3D7579;581;326) , acessado a 3/6/2014
- Venancio, S. A. S., Vieira, A. B., Alencar, N. X., Soares, M. B., S, A. V. S. A., Vieira, A. B., ... Evaluation, S. A. M. B. (2012). Avaliação da técnica de esfoliação com escova citológica para coleta de células conjuntivais em gatos saudáveis □:

comparação entre a face palpebral da membrana nictitante e a conjuntiva palpebral 1, 32(11), 1199–1204.

Vu, H. L., Sikora, A. G., Fu, S., & Kao, J. (2010). HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy. *Cancer Letters*, 288(2), 149–155. doi:10.1016/j.canlet.2009.06.026

Zonta, M. A., Monteiro, J., Santos Jr, G., & Pignatari, A. C. C. (2012). Oral infection by the Human Papilloma Virus in women with cervical lesions at a prison in São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, 78(2), 66–72. Disponível em from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22499372>