

Gustavo Barreto da Cunha

**PAPILOMAVÍRUS HUMANO TRANSCRICIONALMENTE ATIVO NO
CÂNCER DE LARINGE GLÓTICO**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

São Paulo

2019

Gustavo Barreto da Cunha

**PAPILOMAVÍRUS HUMANO TRANSCRICIONALMENTE ATIVO NO
CÂNCER DE LARINGE GLÓTICO**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de São Paulo - Escola Paulista de
Medicina para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Noemi Grigoletto De Biase

Coorientadores:

Prof. Dr. Leonardo Haddad

Prof. Dr. Ricardo Artigiani Neto

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Cunha, Gustavo Barreto da

Papilomavírus humano transcricionalmente ativo no câncer de laringe glótico / Gustavo Barreto da Cunha. - São Paulo, 2019.
x, 25f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Otorrinolaringologia.

Título em inglês: Transcriptionally active human papillomavirus in glottic laryngeal cancer.

1. Neoplasias Laríngeas. 2. Glote. 3. Prega vocal. 4. Infecções por papillomavirus. 5. Hibridização In Situ.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OTORRINOLARINGOLOGIA
E CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO**

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Márcio Abrahão, Professor Livre Docente da Disciplina de Otorrinolaringologia do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Coordenadora do Curso de Pós-graduação:

Profa. Dra. Norma de Oliveira Penido, Professora Adjunto da Disciplina de Otorrinolaringologia do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina.

Gustavo Barreto da Cunha

**PAPILOMAVÍRUS HUMANO TRANSCRICIONALMENTE ATIVO NO
CÂNCER DE LARINGE GLÓTICO**

Banca Examinadora:

Titulares:

Prof. Dr. David Greco Varela

Prof. Dr. Paulo Sérgio Lins Perazzo

Prof. Dr. Onivaldo Cervantes

Suplente:

Prof. Dr. Bruno Teixeira de Moraes

Dedicatória

Dedico esse trabalho à minha família, meu bem maior, pessoas fundamentais, que estão ao meu lado em todas as decisões e que compartilharam comigo todos os momentos dessa jornada.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Leonardo Haddad, pessoa responsável por tudo isso acontecer. Amigo e coorientador pelo qual guardo extrema admiração e que tenho como exemplo para a vida, tanto pessoalmente, pela sua gentileza e objetividade, como profissionalmente, pela competência e zelo ao paciente.

À Prof Dra. Noemi Grigoletto de Biase, orientadora, por todos os ensinamentos. Ao Prof. Dr. José Eduardo de Sá Pedroso, pelas sugestões constantes, e a todo o Departamento de Laringe e Voz, incluindo todos os professores e *fellows*, que contribuíram enormemente com minha formação ao longo desses dois anos, pessoalmente, profissionalmente e academicamente.

Ao Prof. Dr. Ricardo Artigiani Neto, co-orientador, e ao Marcelo Silva, pela parceria do Departamento de Patologia, auxiliando na escolha e execução dos métodos desse estudo.

Ao Dr. Ramirez Fidelis e à Dra. Michelle Queiroz, amigos que me deram suporte profissional imprescindível na conciliação entre trabalho e estudos à distância.

Ao Dr. David Greco Varela, exemplo de ser humano, que me iniciou na laringologia e continua presente de maneira sempre prestativa a compartilhar sua experiência.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Lista de abreviaturas	viii
Resumo	ix
Abstract	x
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
3. REVISÃO DA LITERATURA	5
4. MÉTODO	9
4.1 População e delineamento da pesquisa	9
4.1.1 Grupo controle	9
4.1.2 Cálculo do tamanho amostral	10
4.2 Imunohistoquímica para a proteína p16 ^{INK4a}	10
4.3 Detecção do HPV DNA por hibridização <i>in situ</i>	11
4.4 Análise estatística	11
4.5 Considerações éticas	11
5. RESULTADOS	13
6. DISCUSSÃO	16
7. CONCLUSÃO	20
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
Anexos	
Bibliografia consultada	

Lista de abreviaturas

APC	Apoio em Patologia Cirúrgica
CEC	carcinoma escamocelular
EPM	Escola Paulista de Medicina
EUA	Estados Unidos
HIS	hibridização <i>in situ</i>
HPV	papilomavírus humano
HPV+	papiomavírus humano positivo
HPV-	papilomavírus humano negativo
HPV DNA+	papilomavírus humano DNA positivo
HPV DNA-	papilomavírus humano DNA negativo
IHQ p16	imunohistoquímica para a proteína p16 ^{INK4a}
PCR	reação de polimerase em cadeia
RNA_m	RNA mensageiro
RT-PCR	reação de polimerase em cadeia da transcriptase reversa
TCLE	termo de consentimento livre e esclarecido
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

Resumo

Objetivo: Avaliar a associação do papilomavírus humano em sua forma ativa com o câncer invasivo de laringe glótico. **Método:** Foi realizado um estudo caso-controle, no qual foi estudada a associação do papilomavírus humano transcricionalmente ativo em pacientes diagnosticados com carcinoma escamocelular de laringe glótico e comparado a um grupo controle de pacientes com pólipos de pregas vocais livres de câncer. Foram utilizados a imunohistoquímica para a proteína p16^{INK4a} e a hibridização *in situ* para o DNA do papilomavírus humano para identificação dos casos positivos para o vírus. **Resultados:** No total, 132 indivíduos foram incluídos no estudo, sendo 66 pacientes com carcinoma escamocelular glótico de laringe e 66 participantes no grupo controle. Dentro os indivíduos do grupo de estudo, apenas 8 eram mulheres e tinham uma idade média de 62,3 anos. Tabagismo e carga tabágica associaram-se positivamente com o câncer de laringe. A imunohistoquímica para a proteína p16^{INK4a} foi positiva em 5 dos 66 (7,6%) pacientes com carcinoma escamocelular, enquanto nenhum caso entre os controles foi positivo. Por outro lado, todos os 5 casos apresentaram hibridização *in situ* negativas para o DNA do papilomavírus humano, sendo, portanto, classificados como status papilomavírus humano negativo. A imunohistoquímica para a proteína p16^{INK4a} não se associou significativamente ao carcinoma escamocelular de laringe glótico ou ao status HPV, como também a nenhum grupo específico, apesar de haver uma tendência a associação com grupo câncer de laringe e com os pacientes que nunca fumaram. **Conclusão:** Esse estudo não encontrou associação entre a infecção transcricionalmente ativa pelo HPV e o CEC de laringe glótico.

Abstract

Objective: To evaluate the association of human papillomavirus in its active form and invasive glottic laryngeal cancer. **Method:** We conducted a case-control study to evaluate the association of transcriptionally active human papillomavirus in patients diagnosed with glottic laryngeal squamous cell carcinoma and vocal cord polyps as cancer-free controls. p16^{INK4a} Immunohistochemistry and DNA *in situ* hybridization were used to identify positive cases for the virus. **Results:** In total, 132 subjects were included in the study, 66 patients with laryngeal glottic squamous cell carcinoma and 66 participants in the control group. Among the individuals in the study group, only 8 were women and had a mean age of 62.3 years. Smoking and smoking load were positively associated with laryngeal cancer. p16^{INK4a} immunohistochemistry was positive in 5 of the 66 (7.6%) patients with squamous cell carcinoma, whereas no case among controls was positive. On the other hand, all of the 5 cases presented negative *in situ* hybridization for human papillomavirus DNA and were therefore classified as negative human papillomavirus status. p16^{INK4a} immunohistochemistry was not significantly associated with glottic laryngeal squamous cell carcinoma or human papillomavirus status, nor with any specific group, although there was a tendency to associate with the laryngeal cancer group and patients who never smoked. **Conclusion:** Transcriptionally active papillomavirus did not associate with glottic laryngeal cancer.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de laringe representa 2 a 4,5% de todas as neoplasias malignas e 30% das neoplasias de cabeça e pescoço, sendo que o tumor glótico corresponde a cerca de 2/3 desses tumores. Histologicamente, mais de 90% dos cânceres de prega vocal correspondem ao carcinoma escamocelular (CEC).⁽¹⁾ Os principais fatores de risco relacionados a essa afecção, como também a outras neoplasias de cabeça e pescoço, são o tabagismo e o alcoolismo, fatores esses ainda mais importantes quando associados.⁽²⁾

No entanto, após identificação de uma expressiva parcela de pacientes com CEC de cabeça e pescoço que não se encaixavam nesse perfil, tem-se estudado cada vez mais a relação da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) com o desenvolvimento dessas neoplasias.⁽³⁾ A exposição dos sítios de cabeça e pescoço a esse vírus parece estar associada a comportamentos sexuais específicos e sua carcinogênese se baseia na similaridade entre os tecidos anogenitais e o epitélio escamoso da região de cabeça e pescoço, além da detecção dos genótipos de HPV oncogênicos mais comuns nas duas regiões.^(4, 5)

Diversos trabalhos já demonstraram uma forte associação entre a infecção ativa pelo HPV e o carcinoma de orofaringe.^(6, 7) Esses tumores, identificados por meio da expressão imunohistoquímica da proteína p16^{INK4a} (IHQ p16), possuem diferente comportamento clínico e são associados a melhor prognóstico que os carcinomas de orofaringe não relacionados ao HPV.⁽⁷⁾ No entanto, a relação entre o CEC de laringe e a infecção pelo HPV não é tão bem estabelecida. Existem dados publicados que revelam uma prevalência do vírus em 0% a 75% dos casos de CEC de laringe^(8, 9), porém a maior parte deles descreve uma prevalência entre 5% e 25%^(10, 11), parecendo ser um pouco maior na China (32% a 58,8%)⁽¹²⁾. Essa ampla variação pode ser justificada por diferenças geográficas e étnicas da população, indevida classificação tumoral com análises conjuntamente aos carcinomas de orofaringe, ou mesmo decorrente do uso de diferentes técnicas de detecção do HPV⁽¹¹⁾.

O HPV faz parte de uma família de vírus com DNA de fita dupla curto e circular e pode ser classificado quanto ao seu potencial oncogênico entre baixo e alto risco. Atualmente, já foram identificados mais de 100 tipos de HPV, dos quais 51

são reconhecidos por causar infecção mucosa. Desses, 12 são considerados carcinogênicos (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59), 8 como prováveis carcinogênicos (HPV 26, 53, 66, 67, 68, 70, 73 e 82) e outros 31 tipos de HPV como de carcinogenicidade baixa ou indeterminada.⁽¹³⁾

Tem sido sugerido que a detecção de baixos níveis de HPV-DNA e a ausência de transcrição viral têm um valor biológico limitado e podem indicar que o HPV não teria uma papel causador na transformação maligna do câncer de laringe.^(14, 15) O HPV-DNA tem sido encontrado, inclusive, em tecidos normais e em lesões benignas das pregas vocais⁽¹¹⁾, o que suporta a ideia de que apenas a presença do HPV pode não estar relacionada a um fator causal. Dessa forma, métodos de detecção que reflitam a transcrição ativa do HPV, incluindo a IHQ p16, reação de polimerase em cadeia da transcriptase reversa (RT-PCR) ou hibridização *in situ* (HIS) para o HPV-DNA ou mRNA E6/E7 são necessários para demonstrar o HPV biologicamente significativo.⁽¹⁶⁾

E6 e E7 são duas proteínas primárias produto da transcrição de oncogenes virais de HPVs de alto risco. E6 é capaz de induzir a degradação da proteína supressora tumoral p53, a qual induz à suspensão do ciclo celular e apoptose em situações de estresse celular ou dano ao DNA. A proteína E7, por sua vez, inativa outra proteína supressora tumoral Rb. A proteína Rb previne a progressão para a fase S por meio da ligação ao fator de transcrição E2F, e sua inativação determina uma hiperexpressão da p16^{INK4a} por meio de um mecanismo de biofeedback. A desregulação das proteínas Rb e p53 e a expressão aumentada da p16^{INK4a} promovem a transformação maligna, ao passo que a célula infectada perde a capacidade de maturação, mantendo-se em um estado de ciclo celular contínuo, acompanhado de falha nas vias de ativação da apoptose.⁽¹⁵⁾

Assim, os CECs associados ao HPV apresentam uma expressão aumentada da p16^{INK4a}, enquanto naqueles não relacionados ao HPV a exposição crônica ao tabaco e álcool podem gerar perdas mutacionais dos genes das proteínas p16^{INK4a} e p53, resultando em uma baixa expressão dessa proteína. Dessa forma, o painel imunohistoquímico da p16^{INK4a} tem sido utilizado como um biomarcador substituto da infecção ativa pelo HPV nos carcinomas de cabeça e pescoço⁽¹⁷⁾, principalmente no câncer de orofaringe, mas também no câncer de laringe.⁽¹⁸⁾

A descoberta da relação da infecção pelo HPV com o CEC de cabeça e pescoço, principalmente em pacientes mais jovens e não relacionado ao tabagismo e etilismo, principais fatores de risco dessa doença, traz uma nova perspectiva para essa enfermidade, exigindo da classe médica novas medidas preventivas e terapêuticas para essa doença.

Este estudo visa, portanto, avaliar a associação da infecção ativa do HPV com o CEC de laringe glótico. Até o presente momento, não há trabalhos na literatura avaliando essa relação na população brasileira.

2. OBJETIVO

Avaliar a associação do HPV em sua forma ativa com o câncer invasivo de laringe glótico em uma população brasileira.

3. REVISÃO DA LITERATURA

O carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço origina-se do epitélio do trato aerodigestivo e corresponde a 90% das neoplasias malignas dessa região. Ele representa a sexta causa de câncer no mundo, com incidência aproximada de 400 mil casos por ano, e é responsável por cerca de 200 mil mortes anualmente. Os sítios mais comuns de origem são a cavidade oral e orofaringe, acometendo principalmente a língua, assoalho da boca e tonsilas palatinas.^(19, 20)

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento dos CECs de cabeça e pescoço são classicamente conhecidos como tabagismo, alcoolismo e má higiene oral, porém mais recentemente na última década a incidência dessas neoplasias relacionadas a esses fatores de risco tem diminuído consideravelmente. Por outro lado, a infecção pelo HPV tem sido relacionada ao desenvolvimento de CEC dessa região, especialmente base de língua, palato mole, tonsilas palatinas e paredes da faringe, e a prevalência desse câncer tem aumentado em proporções epidêmicas em diferentes populações, incluindo países da Europa, Estados Unidos (EUA) e do oriente.^(21, 22)

A incidência global do CEC de cabeça e pescoço tem diminuído nos EUA, no entanto, a incidência do CEC de orofaringe caminha em sentido oposto com aumento de sua magnitude, especificamente aqueles relacionados à infecção pelo HPV. No início dos anos 80, estimava-se que o HPV era etiológicamente responsável por cerca de 16% dessas neoplasias, enquanto os mais recentes estudos demonstram prevalências que variam de 45 a 90%, a depender da população e método diagnóstico.^(6, 17) Esse aumento na incidência de CEC de cabeça e pescoço HPV positivo (HPV+) tem sido observado principalmente em pacientes jovens e não relacionados a tabagismo e etilismo, especialmente associados a HPVs de alto risco. O HPV 16 é o subtipo predominante e se relaciona a até 90% das neoplasias de orofaringe HPV+.^(20, 21) Acredita-se que o aumento da incidência da infecção pelo HPV esteja relacionado a mudanças de hábitos sexuais dessas populações nas últimas décadas, já que tem havido uma tendência a um maior número de parceiros sexuais e aumento da prática de sexo oral.⁽²³⁾

É cada vez maior o número de evidências que sugerem que o CEC de orofaringe HPV+, particularmente, tem características únicas quanto à sua

patogênese, epidemiologia e aspectos clínicos. Esse tipo de câncer tem apresentado um prognóstico surpreendentemente melhor quando comparado ao CEC de orofaringe HPV negativo (HPV-), com redução de 20% a 80% no risco de morte pela doença.⁽²⁴⁾ A expressão elevada da proteína p16^{INK4a} no CEC de orofaringe já foi bem caracterizada e se correlaciona fortemente com a positividade para o HPV, representando uma forte evidência de infecção biologicamente relevante.⁽²⁵⁾ O padrão de coloração nuclear e citoplasmático difuso e forte em mais de 70% das células neoplásicas é considerado padrão definitivo de positividade para a p16^{INK4a}, e esse padrão é visto na maior parte das células do câncer de orofaringe, o qual se correlaciona fortemente com a detecção do HPV DNA.^(26, 27)

Por outro lado, a participação do HPV na etiologia dos CECs da laringe e de outros sítios da cabeça e pescoço ainda não foi definitivamente estabelecida. Hernandez et al, por exemplo, encontraram um papel limitado do HPV na carcinogênese laríngea, com expressão da p16^{INK4a} em menos de 10% dos tumores e baixa correlação desse exame com o status HPV DNA. No total, apenas 2% das neoplasias laríngeas foram positivas para p16^{INK4a} e HPV DNA.⁽²⁸⁾ Rodrigo et al, do mesmo modo, não encontraram associação entre HPV e CEC de laringe no norte da Espanha, sugerindo baixa prevalência desse vírus nessa região, além de altos índices de tabagismo e etilismo, fatores de risco clássicos, como principais causadores do câncer nessa população.⁽²⁹⁾

Já Chen et al indicaram uma associação significativa entre a detecção do HPV DNA (6,7%) e o CEC de laringe em uma população chinesa, principalmente entre os mais jovens e aqueles que nunca fumaram e/ou nunca apresentaram etilismo intenso. Apenas 1 dos 20 pacientes HPV DNA positivo (HPV DNA+) apresentaram IHQ p16 negativa, porém 12 dos 300 pacientes com câncer avaliados apresentaram IHQ p16 positiva com HPV DNA negativo (HPV DNA-), representando casos falso-positivos.⁽¹¹⁾ Uma meta-análise publicada em 2013 reportou prevalência de 28% (95% CI 23,5% - 32,9%) do HPV em pacientes com essa neoplasia, porém incluiu apenas estudos que avaliaram a detecção do HPV DNA através de reação de polimerase em cadeia (PCR).⁽³⁰⁾ Um outro trabalho do mesmo ano realizado em um hospital alemão sugeriu um papel causal do HPV16 em uma pequena parcela (4%) dos casos, e os autores consideraram que para a determinação do HPV como fator

etiológico do CEC de laringe é necessária a combinação de alguns marcadores (HPV DNA+, RNA+, p16^{INK4a} alta e pRB baixa).⁽³¹⁾

Young et al, em um estudo australiano, também encontraram baixa positividade da p16^{INK4a} (6,5%) no CEC de laringe, sem correlação com o status HPV, que foi considerada ainda menor por meio da HIS⁽³²⁾, o que encontra correspondência com outros trabalhos menores, com índices de positividade de HPV transcricionalmente ativo de 1,6% a 6,6%^(16, 33-35), investigados por meio de HIS ou RT-PCR do RNA mensageiro (RNAm) das proteínas E6 e E7. Em comparação, outros estudos mais antigos reportaram incidências maiores da infecção pelo HPV, com resultados que variaram de 16%⁽³⁶⁾, 27%⁽³⁷⁾, 35%⁽³⁸⁾ até 75%⁽⁸⁾. No entanto, todos eles utilizaram exame de PCR para HPV DNA como método de detecção, podendo dessa maneira reconhecer tanto formas ativas quanto inativas de infecção pelo HPV, gerando hiperestimativas da participação do vírus na carcinogênese laríngea.⁽³⁹⁾

Dessa forma, a incidência de infecção ativa no CEC de laringe parece ser consistentemente menor que a reportada no CEC de orofaringe. Além disso, o prognóstico do CEC de laringe não parece ser influenciado pela positividade da p16^{INK4a} e infecção pelo HPV do mesmo modo que ocorre no CEC de orofaringe, permanecendo ainda hoje incerta essa relação.⁽³²⁾

Segundo Chen et al, esses resultados tão discrepantes entre os trabalhos que avaliam a participação do HPV no CEC de laringe podem ser explicados por diversos fatores, incluindo diferenças sociodemográficas de cada população estudada, variação na qualidade das amostras testadas, e diferentes sensibilidades e especificidades dos testes diagnósticos utilizados.⁽¹¹⁾

Existem diversos métodos de detecção do status do HPV no CEC de cabeça e pescoço, que englobam desde imunohistoquímica até técnicas moleculares. O padrão de coloração da expressão IHQ p16 é essencial para se predizer o status do HPV no CEC de cabeça e pescoço. É sugerido que para que a amostra seja considerada positiva deve haver coloração difusa nuclear e citoplasmática na maior parte das células ($\geq 70\%$), independente da intensidade da coloração, enquanto a amostra negativa deve haver ausência de coloração em todas as células ou coloração apenas em células tumorais isoladas ($\leq 40\%$). Sugere-se, ainda, que para

os casos de coloração inconclusiva (entre 40% e 70%), outros testes diagnósticos auxiliares são recomendados.⁽⁴⁰⁾

A positividade da p16^{INK4a} na ausência de HPV DNA, como observado em uma parcela dos casos, sugere que a hiperexpressão dessa proteína na carcinogênese laríngea pode refletir alterações celulares não relacionadas ao HPV.⁽²⁸⁾ Já foi demonstrado que a expressão da p16^{INK4a} tem forte associação com o HPV DNA^(16, 36, 41), e também com a detecção do mRNA E6/E7 por HIS, considerado um dos melhores exames para identificação das formas ativas do HPV, especialmente no CEC de orofaringe⁽³³⁾, porém essa questão permanece incerta no CEC de laringe.

4. MÉTODO

4.1 População e delineamento da pesquisa

Trata-se de um estudo caso-controle, no qual foi estudada a associação do HPV transcricionalmente ativo em tumores de pacientes previamente diagnosticados com CEC invasivo de laringe glótica. Foram incluídos indivíduos adultos (> 18 anos) acompanhados pelo Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) - Escola Paulista de Medicina (EPM) no período de julho de 2014 a junho de 2017 que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (anexo 1). Todos os pacientes foram diagnosticados por meio de biópsia da lesão sob laringoscopia de suspensão e análise anatomopatológica do material excisado.

Os dados acerca de gênero, idade, etilismo, tabagismo e carga tabágica foram coletados por meio de revisão dos prontuários dos pacientes.

Foram considerados tabagistas aqueles que já fumaram pelo menos 100 cigarros e que fumam atualmente, ex-tabagistas aqueles que já fumaram pelo menos 100 cigarros, mas não fumam no momento da entrevista, e nunca fumante aqueles que nunca fumaram cigarro ou que fumaram menos de 100 cigarros durante a vida, seguindo os critérios propostos pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC).⁽⁴²⁾

Em relação ao alcoolismo, foram considerados etilistas aqueles pacientes com história de ingestão alcoólica diária ou quase diária ou de grande intensidade seguindo os critérios de Elahi (2002)⁽⁴³⁾, que classifica o etilismo pesado como consumo maior ou igual a 28 doses de álcool por semana por pelo menos 10 anos. A dose de álcool corresponde a 10 a 12 gramas de álcool, o que equivale a uma dose de bebida destilada (30mL), uma lata de cerveja (330mL) ou uma taça de vinho.

Foram excluídos do estudo todos pacientes tratados previamente com quimioterapia ou radioterapia ou que não aceitaram participação na pesquisa.

4.1.1 Grupo controle

O grupo controle foi formado por pacientes submetidos a microcirurgia de laringe para exérese de pólipos vocais, lesão sabidamente benigna, no mesmo período do estudo. Foram excluídos do estudo os pacientes homens com menos de 38 anos e mulheres com menos de 50 com o objetivo de tornar a amostra mais parecida com o grupo de estudo. Foram excluídos também aqueles que apresentavam na anatomia patológica sinais de displasia ou que evoluíram com câncer de cabeça e pescoço durante o acompanhamento.

4.1.2 Cálculo do tamanho amostral

Esperando-se encontrar positividade da expressão IHQ p16 em 10% das amostras, com base em literatura prévia, e sendo considerada 5% de chance de erro amostral e 80% de poder de se encontrar associação, foram incluídos 66 participantes em cada grupo de estudo. O grupo caso foi formado por pacientes diagnosticados com câncer de laringe glótico e o grupo controle por pacientes diagnosticados com pólipos de laringe.

4.2 Imunohistoquímica para a proteína p16^{INK4a}

A confecção das lâminas e as reações imunohistoquímicas para o anticorpo p16^{INK4a} foram realizadas no Departamento de Patologia da UNIFESP - EPM em parceria com o laboratório Apoio em Patologia Cirúrgica (APC). Foram utilizadas as amostras obtidas a partir das biópsias dos tumores e dos pólipos, armazenados em blocos de parafina no mesmo departamento, e preparados com uso do anticorpo primário monoclonal GeneAB clone IHC 016 (GenomeMe, Canadá).

O padrão de imunomarcagem do p16^{INK4a} é citoplasmático e nuclear e a avaliação foi baseada na extensão da coloração, ou seja, na porcentagem de células neoplásicas coradas.

Foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram marcação nuclear e citoplasmática na maioria das células tumorais (> 70%), independente da intensidade da coloração. No entanto foram consideradas negativas as amostras que apresentaram ausência completa da p16^{INK4a}, ou que apresentaram marcação apenas em células tumorais isoladas (< 40%). E as

amostras com padrão de coloração intermediária (entre 40 e 70%) foram classificadas como inconclusivas.⁽⁴⁰⁾

4.3 Detecção do HPV DNA por hibridização *in situ* (HIS)

A HIS foi realizada pelo Departamento de Patologia da UNIFESP - EPM em parceria com o laboratório APC por meio de técnica manual utilizando o kit Zytovision PLUS CISH Implementation (Zytovision, Germany) com a capacidade de detecção dos genótipos de alto risco 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68, e 82, além dos genótipos de baixo risco 6 e 11.

Os casos foram classificados de maneira binária em positivo ou negativo. Resultados negativos na HIS foram considerados como status HPV negativo.

4.4 Análise estatística

Para elaboração do banco de dados e análise descritiva foi utilizado o software *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA), versão 17.0 *for Windows*. Os resultados foram apresentados por meio de tabelas e gráficos. As variáveis categóricas expressas em frequências e percentuais – n (%). As variáveis contínuas com distribuição normal foram expressas em média e desvio padrão, e aquelas com distribuição não-normal em mediana e intervalo interquartil. A normalidade das variáveis numéricas foi verificada por meio da estatística descritiva, análise gráfica e do teste Shapiro-wilk.

Para a comparação das variáveis clínicas e demográficas entre os grupos CEC e controle e comparação dos grupos de IHQ p16 positiva e negativa dentre o grupo de indivíduos com CEC foi utilizado o teste qui-quadrado para variáveis categóricas. O teste exato de Fisher foi utilizado quando a variável apresentava um número reduzido de indivíduos. Para a comparação das variáveis numéricas entre esses grupos foi utilizado o teste t independente para aquelas com distribuição normal e teste Mann-whitney para aquelas com distribuição não-paramétrica. Para todas as análises foi considerado um $p < 0,05$.

4.5 Considerações éticas

O projeto de pesquisa foi inscrito na Plataforma Brasil, sob o número de certificado de apresentação para apreciação ética 73113417.0.0000.5505, e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo como projeto de pesquisa nº 0946/2017 com parecer nº 2.317.761 de 05/10/2017 (Anexo 2).

Os pesquisadores não possuem conflito de interesse.

O pesquisador principal possui bolsa de estudo fornecida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

5. RESULTADOS

Cento e trinta e dois indivíduos foram incluídos no estudo, sendo 66 pacientes com CEC de laringe glótico e 66 participantes no grupo controle com diagnóstico de pólipos de laringe. As características clínicas e demográficas dos indivíduos participantes estão detalhadas na tabela 1.

Tabela 1. Características clínicas e demográficas dos pacientes com CEC de laringe glótico e controles.

	Casos (n=66)	Controles (n=66)	Valor de p
Idade	62,3 ±9,2	44,5 ±11,8	<0,001*
Gênero			<0,001 ^α
Feminino	8 (12,1)	28 (42,4)	
Masculino	58 (87,9)	38 (57,6)	
Tabagismo			0,005 ^α
Tabagista/ex-tabagista	51 (77,3)	31 (53,4)	
Não tabagista	15 (22,7)	27 (46,6)	
Carga Tabágica	44,5 (25-60)	20 (10-25)	<0,001 ^λ
Etilismo			0,827 ^α
Sim	9 (15,5)	6 (14,0)	
Não	49 (84,5)	37 (86,0)	
IHQ p16			0,058 ^β
Positiva	5 (7,6)	0	
Inconclusiva	1 (1,5)	0	
Negativa	60 (90,9)	66 (100,0)	
Status HPV			
Negativo	66 (100,0)	66 (100,0)	1,00 ^α

*Teste T independente; ^α=Teste Qui-quadrado; ^β= Teste exato de Fischer; ^λ= Teste Mann-whitney; HPV= Papilomavírus humano; IHQ p16= Imunohistoquímica para a proteína p16^{INK4a}.

Em relação ao grupo de estudo, todos os pacientes foram diagnosticados com apenas um tumor primário e não receberam tratamento anterior à cirurgia. Apenas 8 eram mulheres e tinham uma idade média de 62,3 anos (±9,2). Pacientes

tabagistas/ex-tabagistas apresentaram associação com o CEC de laringe, assim como a carga tabágica (figura 1).

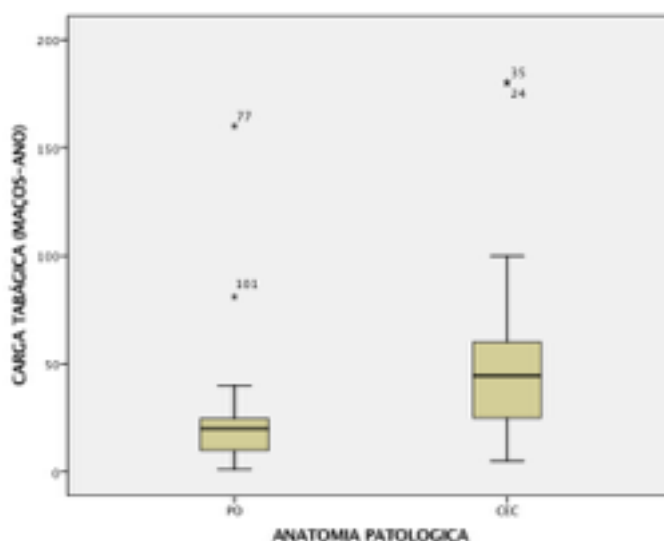


Figura 1. Box-plot associação entre casos e controles e carga tabágica. CEC= carcinoma escamocelular; PO= pólipo.

Cinco dos 66 (7,6%) pacientes com CEC foram positivos para a IHQ p16, seguindo o critério de coloração nuclear e citoplasmática em mais de 70% das células tumorais, enquanto nenhum caso entre os controles foi positivo. Por outro lado, todos os 5 casos apresentaram HIS negativas para o HPV DNA, sendo, portanto, classificados como status HPV negativo.

O estadiamento dos pacientes com CEC de laringe está representado na figura 2. Dentre esses pacientes, a IHQ p16 foi positiva em 3 casos de tumor T1A (60%), 1 caso T1B (20%) e 1 caso T3 (20%).

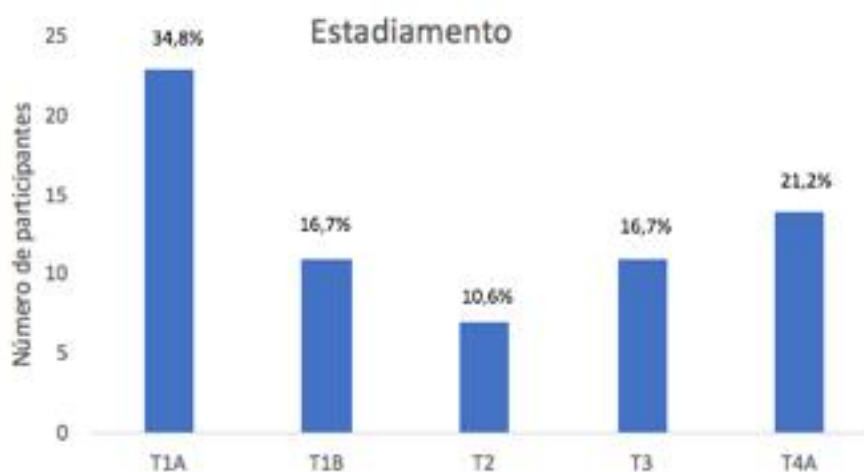


Figura 2. Estadiamento dos pacientes com CEC de laringe.

A distribuição da IHQ p16 entre o grupo com CEC de laringe está representada na tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos pacientes com CEC de laringe glótico segundo características demográficas e imunohistoquímica para a proteína p16^{INK4a} (IHQ p16).

	IHQ p16 Positiva (n=5)	IHQ p16 Negativa/ Inconclusiva (n=61)	Valor de p
Idade	56,0 ±6,2	62,7 ±9,3	0,115*
Gênero			0,487 ^β
Feminino	1 (20,0)	7 (11,5)	
Masculino	4 (80,0)	54 (88,5)	
Tabagismo			0,073 ^β
Tabagista/Ex-tabagista	2 (40,0)	49 (80,3)	
Não fumante	3 (60,0)	12 (19,7)	
Carga Tabagica	41,5 (34-41,5)	45 (25-60)	0,773 ^λ
Etilismo			0,114 ^α
Sim	2 (40,0)	7 (13,2)	
Não	3 (60,0)	46 (86,2)	

*Teste T independente; ^α=Teste Qui-quadrado; ^β= Teste exato de Fischer; ^λ= Teste Mann-whitney; IHQ p16= Imunohistoquímica para a proteína p16^{INK4a}.

6. DISCUSSÃO

O HPV é um vírus pequeno composto de capsídeo contendo uma fita dupla de DNA circular e está envolvido na gênese de tumores benignos e malignos em diversos sítios como colo do útero, região anogenital e pele.⁽⁴⁴⁾ Enquanto a participação do HPV na carcinogênese do câncer de orofaringe já está bem estabelecida, a sua relação com outros CECs da região de cabeça e pescoço continua controversa.^(6,9, 25)

Existe uma grande variação na proporção de CEC de laringe relacionado ao HPV na literatura. Além da variação demográfica e étnica, a grande variação nos testes diagnósticos utilizados pode influenciar esse resultado.⁽¹¹⁾ No presente estudo não foram identificados casos de CEC de laringe glótico relacionados à infecção transcricionalmente ativa do HPV. Com o objetivo de confirmação dos resultados da IHQ p16, evitando-se casos falso-positivos, foi realizada reação de HIS em todos os casos positivos para a IHQ p16. Assim, apesar da IHQ p16 ter sido positiva em 5 de 66 casos (7,6%), o resultado da HIS para o DNA HPV foi negativo em todas essas amostras, demonstrando status negativo para o HPV.

Rodrigo et al em estudo no norte da Espanha também não encontraram papel significativo do HPV no câncer de laringe. Apenas 1 paciente de 62 (1,6%) apresentou HPV DNA 16 e RT-PCR para RNAm E6 positivos. Porém, esse paciente tinha 85 anos, história de tabagismo e etilismo pesados e apresentou ainda p53 positivo e HIS negativa para o HPV DNA, sendo questionada a real participação do HPV na carcinogênese desse paciente. Nesse trabalho, 11% dos tumores de laringe foram positivos para a IHQ p16, ou seja, um alto índice de falso-positivos e baixa correlação com o status HPV.⁽²⁹⁾ De forma semelhante, Lee et al, ao investigarem o HPV transcricionalmente ativo apenas no câncer de laringe glótico, sugeriram que o HPV não parece ter um papel causal nesse tipo de tumor e que a detecção desse vírus pode ser apenas incidental.⁽⁴⁵⁾ E Fakhyr et al reportaram ausência de infecção pelo HPV, investigado através de PCR e HIS, em uma população de 34 pacientes com câncer de laringe.⁽⁷⁾

Por outro lado, outros trabalhos que investigaram essa relação demonstram uma associação pequena porém positiva entre o HPV ativo e o CEC de laringe, variando de 1,6% a 6,7%^(11, 33-35). Chernock et al reportaram que apenas 4 de 60

pacientes (6,7%) apresentavam HPV RNAm E6/E7⁽¹⁶⁾ e Hernandez et al demonstraram uma taxa de apenas 2% de positividade na IHQ p16 e HPV DNA no CEC de laringe.⁽²⁸⁾ Ambos os trabalhos não encontraram relação significativa da expressão da p16^{INK4a} com o status HPV DNA, diferentemente do que é descrito no CEC de orofaringe, que tem um papel etiológico e prognóstico já bem estabelecido⁽⁷⁾.

Estudos mais antigos ou que investigaram apenas a presença do HPV tendem a apresentar uma prevalência maior, chegando a 16%⁽³⁶⁾, 27%⁽³⁷⁾, 35%⁽³⁸⁾ e até 75%⁽⁸⁾ dos casos. Porém, esses trabalhos utilizaram o PCR para detecção do HPV DNA como método diagnóstico, método que não confirma a integração do HPV DNA no núcleo da célula tumoral e não comprova um papel causal do vírus na carcinogênese laríngea, gerando hiperestimativas dessa participação.⁽³⁹⁾ Portanto, a presença do HPV em muitos tumores parece ser apenas incidental. Já foi demonstrado, inclusive, a detecção do HPV DNA em proporção significativa de lesões benignas da laringe.^(11, 46)

Nosso trabalho é um dos poucos estudos que avaliou a participação do HPV apenas no CEC de laringe glótico. Lee et al também não encontraram relação da infecção pelo HPV e carcinogênese nessa população.⁽⁴⁵⁾ Existem poucos trabalhos comparando a prevalência da infecção pelo HPV no câncer glótico e supraglótico, porém são estudos mais antigos que não diferenciam as formas ativas das inativas do HPV, além de ter amostras muito pequenas, tornando difícil se chegar a conclusões confiáveis⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾. Nesse sentido, é possível que o CEC de laringe supraglótico tenha um comportamento mais parecido com o CEC de faringe de uma maneira geral do que com o CEC da região glótica propriamente dita, justificando esses achados.

Nesse estudo, a IHQ p16 não se associou significativamente ao CEC de laringe glótico ou ao status HPV, como também a nenhum grupo específico, apesar de haver uma tendência a associação com grupo CEC de laringe e com os pacientes que nunca fumaram. Os CECs associados ao HPV apresentam uma expressão aumentada da p16^{INK4a}, enquanto aqueles relacionados à exposição crônica ao tabaco e álcool tendem a gerar perdas mutacionais dos genes das proteínas p16^{INK4a} e p53, resultando em baixa expressão dessas proteínas. Por isso, a IHQ p16 tem sido utilizada como um biomarcador da infecção ativa pelo HPV nos

CEC de cabeça e pescoço, especialmente o de orofaringe.⁽¹⁷⁾ Gheit et al sugeriram o uso desse marcador também no CEC de laringe relacionado ao HPV⁽¹⁸⁾, porém a maioria dos trabalhos publicados até o presente momento não encontrou uma boa correlação entre a hiperexpressão da p16^{INK4a} e a infecção ativa no CEC dessa região, sugerindo que a hiperexpressão dessa proteína na carcinogênese laríngea pode refletir alterações celulares não relacionadas ao HPV. Alguns tumores podem apresentar a p16^{INK4a} positiva devido a mutação e inativação da proteína Rb ou amplificação da E2F.⁽²⁸⁾ Dessa forma, as evidências sugerem que a IHQ p16 isoladamente não seja um marcador confiável para avaliação da participação do HPV na carcinogênese do CEC de laringe.^(11, 16, 28, 32, 51)

Como esperado, o grupo de pacientes que fumam ou que já fumaram se associaram ao CEC de laringe, assim como a carga tabágica. O grupo de pacientes etilistas, porém, não apresentou a mesma associação. A falta de informações sobre o etilismo no prontuário, principalmente entre os pacientes com pólipos de laringe parece ter prejudicado essa avaliação. Esses são os dois principais fatores de risco relacionados ao desenvolvimento dos CECs de cabeça e pescoço.⁽²⁾ Houve, ainda, uma diferença em relação ao gênero e idade entre os grupos de estudo e o grupo controle. Os pólipos são lesões de laringe sabidamente benignas que acometem pacientes jovens (abaixo de 40 anos) e que, apesar de se relacionarem mais ao sexo masculino, apresentam também um alta prevalência no sexo feminino (55% vs 45%, respectivamente)⁽⁵²⁾, enquanto o CEC acomete mais comumente homens numa proporção maior e de idade mais avançada⁽¹⁾, o que explica a diferença encontrada.

Esse trabalho apresenta algumas limitações. Como os pacientes foram avaliados de maneira retrospectiva, os exames foram realizados utilizando os blocos de parafina das amostras obtidas nas cirurgias dos pacientes. Houve perda de dados relacionados ao preenchimento dos prontuários, principalmente àqueles acerca do etilismo e do grupo controle portadores de pólipos de laringe. E, ainda, número limitado de participantes, o que pode ter contribuído para não se ter identificado nenhum caso HPV+. Ainda assim, esse trabalho apresenta algumas outras vantagens, como utilizar exames que avaliam o HPV transcricionalmente ativo ao invés de apenas detectar a presença do vírus nas amostras, o qual poderia não estar relacionado à carcinogênese do tumor, além de avaliar isoladamente um

único sítio tumoral, a região glótica, evitando generalização de comportamento de outros sítios da laringe, sendo o primeiro estudo a realizar essa investigação em uma população brasileira.

7. CONCLUSÃO

Esse estudo não encontrou associação entre a infecção transcricionalmente ativa pelo HPV e o CEC de laringe glótico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Schultz P. Vocal fold cancer. *Eur Ann otorhinolaryngol Head Neck Dis.* 2011;128:301-8.
2. Osei-Sarfo K, Tang XH, Urvalek AM, Scognamiglio T, Gudas LJ. The molecular features of tongue epithelium treated with the carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide and alcohol as a model for HNSCC. *Carcinogenesis.* 2013;34(11):2673-81.
3. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Pawlita M, Turek LP. Complex etiology underlies risk and survival in head and neck cancer human papillomavirus, tobacco, and alcohol: a case for multifactor disease. *J Oncol.* 2012;2012:571862.
4. Heck JE, Berthille J, Vacarella S, Winn DM, Smith EM, Shan'gina O, et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol.* 2009;39(1):166-81.
5. Rubenstein LM, Smith EM, Pawlita M, Haugen TH, Hamšíková E, Turek LP. Human papillomavirus serologic follow-up response and relationship to survival in head and neck cancer: a case-comparison study. *Infect Agent Cancer.* 2011;8;6:9.
6. Mallen-St Clair J, Alani M, Wang MB, et al. Human papillomavirus in oropharyngeal cancer: The changing face of a disease. *Biochim Biophys Acta.* 2016;1866(2): 141-150.
7. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(4):261–9.
8. Duran A, Descamps G, Arafa M, Decaestecker C, Rimmelink M, Sirtaine N, et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol.* 2011;39(1): 51–9.
9. Gallo A, Degener AM, Pagliuca G, Pierangeli A, Bizzoni F, Greco A, et al. Detection of human papillomavirus and adenovirus in benign and malignant lesions of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009; 141(2):276–81.
10. Tsimplaki E, Argyri E, Sakellaridis A, Kyrodimos E, Xesfyngi D, Panotopoulou E, et al. Oropharyngeal and laryngeal but not oral cancers are strongly associated with high-risk human papillomavirus in 172 Greek patients. *J Med Virol.* 2017;89(1): 170-6.
11. Chen X, Gao L, Sturgis EM, Liang Z, Zhu Y, Xia X, et al. HPV16 DNA and integration in normal and malignant epithelium: implications for the etiology of laryngeal squamous cell carcinoma. *Ann Oncol.* 2017;28(5):1105-10.

12. Zhang C, Deng Z, Chen Y, Suzuki M, Xie M. Is there a higher prevalence of human papillomavirus infection in Chinese laryngeal cancer patients? A systematic review and meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016; 273(2):295-303.
13. Bernard HU, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers EM. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology.* 2010;401(1):70–9.
14. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(1):24–35.
15. Fusconi M, Campo F, Gallo A, Zambetti G, Martellucci S, Seccia A, et al. Laryngeal Cancer, HPV DNA vs E6/E7 mRNA Test: A Systematic Review. *J Voice.* 2017;31(2):248.e1-248.e5.
16. Chernock RD, Wang X, Gao G, Lewis Jr. JS, Zhang Q, Thorstad WL, et al. Detection and significance of human papillomavirus, CDKN2A(p16) and CDKN1A(p21) expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol.* 2013;26(2): 223–31.
17. Benson E, Li R, Eisele D, Fakhry C. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2014;50(6):565-74.
18. Gheit T, Abedi-Ardekani B, Carreira C, Missad CG, Tommasino M, Torrente MC. Comprehensive analysis of HPV expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Med Virol.* 2014;86(4):642-6.
19. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2893–917.
20. Villagómez-Ortíz VJ, Paz-Delgadillo DE, Marino-Martínez I, Ceseñas-Falcón LÁ, Sandoval-de la Fuente A, Reyes-Escobedo A. Prevalence of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the oral cavity , oropharynx and larynx. *Cir Cir.* 2016;84(5):363-8.
21. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol.* 2010;2:15.x`
22. Westra WH. The morphologic profile of HPV-associated head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis, and clinical management. *Head Neck Pathol.* 2012;6:48–54.
23. Johnson AM, Mercer CH, Beddows S, de Silva N, Desai S, Howell-Jones R. Epidemiology of, and behavioural risk factors for, sexually transmitted human papillomavirus infection in men and women in Britain. *Sex. Transm. Infect.* 2012. 88(3):212–7.

24. Chaturvedi AK. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol.* 2012;6:S16-24
25. Langendijk JA, Psyrri A. The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Ann. Oncol.* 2010;21(10):1931–4.
26. El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck.* 2012;34(4):459–61.
27. Lewis JS Jr. p16 Immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol.* 2012;6:S75–S82.
28. Hernandez BY, Rahman M, Lynch CF, Cozen W, Unger ER, Steinau M, et al. p16(INK4A) expression in invasive laryngeal cancer. *Papillomavirus Research.* 2016;2:52-55.
29. Rodrigo JP, Hermsen MA, Fresno MF, Brakenhoff RH, García-Velasco F, Snijders PJ, et al. Prevalence of human papillomavirus in laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain. *Cancer Epidemiol.* 2015;39(1):37–41.
30. Li X, Gao L, Li H, Gao J, Yang Y, Zhou F, et al. Human papillomavirus infection and laryngeal cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *J Infect Dis.* 2013;207(3): 479–88.
31. Halec G, Holzinger D, Schmitt M, Flechtenmacher C, Dyckhoff G, Lloveras B, et al. Biological evidence for a causal role of HPV16 in a small fraction of laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2013;109(1):172–83.
32. Young RJ, Urban D, Angel C, Corry J, Lyons B, Vallance N, et al. Frequency and prognostic significance of p16(INK4A) protein over expression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2015; 112(6):1098-104.
33. Bishop JA, Ma XJ, Wang H, Luo Y, Illei PB, Begum S, et al. Detection of transcriptionally active high-risk HPV in patients with head and neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA in situ hybridization method. *Am J Surg Pathol.* 2012;36(12):1874–82.
34. Lewis JS Jr., Ukpo OC, Ma XJ, Flanagan JJ, Luo Y, Thorstad WL, et al. Transcriptionally-active high-risk human papillomavirus is rare in oral cavity and laryngeal/hypopharyngeal squamous cell carcinomas—a tissue microarray study utilizing E6/E7 mRNA in situ hybridization. *Histopathology.* 2012;60(6):982–91.
35. Bussu F, Sali M, Gallus R, Vellone VG, Zannoni GF, Autorino R, et al. HPV infection in squamous cell carcinomas arising from different mucosal sites of the head and neck region. Is p16 immunohistochemistry a reliable surrogate marker? *Br J Cancer.* 2013;108(5):1157–62.

36. Baumann JL, Cohen S, Evjen AN, Law JH, Vadivelu S, Attia A, et al. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 2009;119(8):1531–37.
37. Stephen JK, Chen KM, Shah V, Havard S, Lu M, Schweitzer VP, et al. Human papillomavirus outcomes in an access-to-care laryngeal cancer cohort. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;146(5):730–8.
38. Morshed K. Association between human papillomavirus infection and laryngeal squamous cell carcinoma. *J Med Virol*. 2010;82(6):1017–23.
39. Wang H, Sun R, Lin H, Hu WH. P16INK4A as a surrogate biomarker for human papillomavirus-associated oropharyngeal carcinoma: consideration of some aspects. *Cancer science*. 2013;104(12):1553–9.
40. Chen ZW, Weinreb I, Kamel-Reid S, Perez-Ordoñez B. Equivocal p16 immunostaining in squamous cell carcinoma of the head and neck: staining patterns are suggestive of HPV status. *Head Neck Pathol*. 2012;6(4):422–9.
41. Laco J, Slaninka I, Jirasek M, Celakovsky P, Vosmikova H, Ryska A. High-risk human papillomavirus infection and p16INK4a protein expression in laryngeal lesions. *Pathol Res Pract*. 2008;204(8):545–52.
42. Centers for Disease Control and Prevention. Adult tobacco use information [Internet]. Atlanta (GA): CDC; [updated 2011 Dec 9]. Glossary; [reviewed 2017 Aug 29; updated 2017 Aug 29; cited 2017 Sep 9]; [about 1 screen]. Available from: https://www.cdc.gov/nchs/nhis/tobacco/tobacco_glossary.htm.
43. Elahi A, Zheng Z, Park J, Eyring K, McCaffrey T, Lazarus P. The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis*. 2002;23(7):1229–34.
44. Zur Hausen H. Papillomavirus infections—a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta*. 1996;1288(2):F55–78.
45. Lee SY, Cho NH, Choi EC, Kim WS, Kim SH. Is human papillomavirus a causative factor of glottic cancer? *J Voice*. 2011;25(6):770–4.
46. Rihkanen H, Peltomaa J, Syrjanen S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in vocal cords without laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol*. 1994;114(3):348–51.
47. Hoshikawa T, Nakajima T, Uhara H, Gotoh M, Shimosato Y, Tsutsumi K, et al. Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinomas by polymerase chain reaction. *Laryngoscope*. 1990;100(6):647–50.
48. Almadori G, Cadoni G, Cattani P, Posteraro P, Scarano E, Ottaviani F, et al. Detection of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinoma by polymerase chain reaction. *Eur J Cancer*. 1996;32A(5):783–8.

49. Smith EM, Summersgill KF, Allen J, Hoffman HT, McCulloch T, Turek LP, et al. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 2000;109(11):1069–76.
50. Dahlstrom KR, Adlers-Storthz K, Etzel CJ, Liu Z, Dillon L, El-Naggar AK, et al. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. *Clin Cancer Res.* 2003;9(7):2620-6.
51. Salazar CR, Anayannis N, Smith RV, Wang Y, Haigents M Jr., Garg M, et al. Combined p16 and human papillomavirus testin predicts head and neck cancer survival. *Int J Cancer.* 2014;135(10):2404–12.
52. Zhukhovitskaya A, Battaglia D, Khosla SM, Murry T, Sulica L. Gender and age in benign vocal fold lesions. *Laryngoscope.* 2015 Jan;125(1):191-6.

Anexos

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P16^{INK4a} NO CÂNCER INVASIVO DE LARINGE

O objetivo desse estudo é avaliar a presença do papilomavírus humano (HPV) em sua forma ativa no câncer invasivo de laringe em uma população brasileira, além de identificar fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de câncer de laringe relacionado ao HPV.

Sua participação é voluntária e não está ligada ao seu tratamento médico. Os dados acerca do paciente serão obtidos a partir de análise de prontuário e a pesquisa do HPV será estudada através da expressão imunohistoquímica da proteína p16^{INK4a} (exame de laboratório) utilizando o material biopsiado/excisado durante sua cirurgia e armazenado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital São Paulo - UNIFESP/EPM.

O grupo controle do trabalho será formado por pacientes que realizaram cirurgia para exérese de pólipos de laringe (lesão sabidamente benigna) e o mesmo estudo da expressão da proteína p16^{INK4a} será realizado no material excisado. Não há nenhum benefício direto para os participantes.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos pesquisadores responsáveis pela pesquisa. O pesquisador principal é o Dr. Gustavo Cunha, que pode ser encontrado na Rua Pedro de Toledo 957. Telefone 5573- 2740. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o comitê de ética em pesquisa (CEP) – Rua Botucatu 572, - 1o andar- cj 14, 5571- 1062. FAX 5539- 7162. Email: cepunifesp@epm.br

É garantida a retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na instituição.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com os dados de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Você tem o direito de se manter atualizado sobre os resultados parciais da pesquisa.

Não há nenhum tipo de despesa para o participante. Estão sendo disponibilizadas duas vias originais do TCLE, uma ficando em posse do participante da pesquisa e outra em posse do pesquisador responsável.

Acredito ter sido suficientemente informado sobre as informações que li ou foram lidas para mim, descrevendo o estudo “EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P16^{INK4a} NO CÂNCER INVASIVO DE LARINGE”.

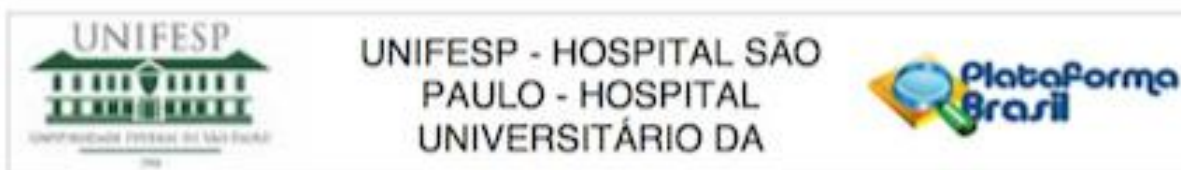
Eu, _____, discuti com o Dr. Gustavo Barreto da Cunha sobre minha decisão em participar desse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos desse estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia de acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar desse estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesse serviço.

Assinatura do participante do estudo / representante legal. Data / /

Declaro que recebi de forma voluntária e apropriada o Consentimento Livre e Esclarecido desse paciente ou representante legal para participação no estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo. Data / /

Anexo 2 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA P16INK4a NO CÂNCER INVASIVO DE LARINGE

Pesquisador: Gustavo Barreto da Cunha

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 73113417.0.0000.5505

Instituição Proponente: Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.317.761

Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n: 0946/2017 (parecer final)

Este estudo visa avaliar a expressão imunohistoquímica da p16INK4a, como forma de estimar a relação dessa neoplasia com a infecção pelo HPV. Até o presente momento, não há trabalhos na literatura avaliando essa relação na população brasileira. Trata-se de um estudo retrospectivo, no qual será estudada a expressão imunohistoquímica da proteína p16INK4a em tumores de pacientes previamente diagnosticados

com CEC de laringe acompanhados pelo Setor de Laringologia e Voz do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP - EPM no período de julho de 2014 a junho de 2017, totalizando 34 pacientes. Será utilizado como grupo controle amostras parafinadas de pacientes submetidos a microcirurgia de laringe para exérese de pólipos vocais, lesão sabidamente benigna, no mesmo período do estudo.

Objetivo da Pesquisa:

-Hipótese: A descoberta da relação da infecção pelo HPV com o CEC de cabeça e pescoço, principalmente em pacientes mais jovens e não relacionado ao tabagismo e etilismo, principais fatores de risco dessa doença, traz uma nova perspectiva para essa enfermidade, exigindo da classe médica novas medidas preventivas e terapêuticas para essa doença. No entanto, ainda é

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55

Bairro: VILA CLEMENTINO

UF: SP

Município: SÃO PAULO

CEP: 04.020-050

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.317.761

preciso estabelecer a relação dessa infecção viral com o carcinoma de laringe e mais ainda na população brasileira em específico, já que, por se tratar de doença infecciosa, a prevalência pode variar a depender da localização geográfica e etnia populacional.

-Objetivo Primário: Avaliar a presença do HPV em sua forma ativa no câncer invasivo de laringe em uma população brasileira.

-Objetivo Secundário: Identificar fatores de risco relacionados ao desenvolvimento de câncer de laringe relacionado ao HPV.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador declara: -Riscos: Esse trabalho não acarretará risco para os pacientes, pois serão utilizados os blocos de parafina armazenados no Departamento de Patologia do Hospital São Paulo - UNIFESP/EPM de pacientes previamente diagnosticados com CEC de laringe e revisão de prontuário dos mesmos. -Benefícios: Não haverá benefícios diretos aos pacientes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de mestrado de Gustavo Barreto da Cunha. Orientação de Dra. Noemi de Biase. Participação de Dr. Leonardo Haddad. Projeto vinculado ao Departamento de Otorrinolaringologia da Escola Paulista de Medicina ? UNIFESP. TIPO DE ESTUDO: Trata-se de um estudo retrospectivo, no qual será estudada a expressão imunohistoquímica da proteína p16INK4a em tumores de pacientes previamente diagnosticados com CEC de laringe acompanhados pelo Setor de Laringologia e Voz do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP - EPM no período de julho de 2014 a junho de 2017. LOCAL: Departamento de Patologia do Hospital São Paulo - UNIFESP/EPM.; Departamento de Otorrinolaringologia. PARTICIPANTES: análise de amostras de 34 pacientes. Critério de Inclusão: Pacientes previamente diagnosticados com CEC de laringe acompanhados pelo Setor de Laringologia e Voz do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP -EPM no período de julho de 2014 a junho de 2017 PROCEDIMENTOS: -Todos os pacientes foram diagnosticados

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: oep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.317.761

através de biópsia da lesão sob laringoscopia de suspensão e análise anatomopatológica do material excisado. Os dados acerca de gênero, idade, etilismo e tabagismo serão coletados por meio de revisão dos prontuários dos pacientes. -Imunohistoquímica: A confecção das lâminas e as reações imunohistoquímicas para o anticorpo p16INK4a serão realizadas no Departamento de Patologia do Hospital São Paulo - UNIFESP/EPM. Serão utilizados os blocos de parafina preparados a partir dos produtos de biópsia dos tumores, armazenados no mesmo departamento. O padrão de imunomarcagem do p16INK4a é citoplasmático e nuclear e a avaliação será baseada na extensão da coloração, ou seja, na porcentagem de células neoplásicas coradas. Serão consideradas amostras HPV positivas (HPV+) aquelas que apresentarem marcação nuclear e citoplasmática na maioria das células tumorais (> 70%), independente da intensidade da coloração. No entanto serão consideradas HPV negativas (HPV-) as amostras que apresentarem ausência completa da p16INK4a, ou que apresentarem marcação apenas em células tumorais isoladas (< 40%). E as amostras com padrão de coloração intermediária (entre 40 e 70%) como inconclusiva. 19 Grupo Controle Será utilizado como grupo controle amostras parafinadas de pacientes submetidos a microcirurgia de laringe para exérese de pólo vocal, lesão sabidamente benigna, no mesmo período do estudo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1- Foram apresentados os principais documentos: folha de rosto; projeto completo; cópia do cadastro CEP/UNIFESP, orçamento financeiro e cronograma apresentados adequadamente. 2-TCLE: solicitada dispensa, com a justificativa de ser análise retrospectiva de prontuários e blocos de parafina (Pasta: TCLE / Termos de Assentimento /

Justificativa de Ausência - Submissão 1; Documento: Dispensa_TCLE.docx) 3- outros documentos importantes anexados na Plataforma Brasil: a)- autorização da COEP (Pasta: Declaração de

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.020-050
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.317.761

Instituição e

Infraestrutura- Submissão 1; Documento: Oficio_diretoria.pdf)

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Trata-se de respostas a pendências. Projeto aprovado.

1- Será necessário enviar carta de ciência /autorização do guardião dos blocos de parafina (responsável pelo Departamento de Patologia), permitindo o uso deste material neste estudo.

RESPOSTA: Encaminho em anexo a carta de ciência/autorização de utilização dos blocos de parafina para a realização da pesquisada assinada pelo Dr. Ricardo Artigiani Neto, chefe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital São Paulo - UNIFESP/EPM e responsável pelos blocos de parafina armazenados no Departamento.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

2- Esclarecer quem será o patologista envolvido com a pesquisa.

RESPOSTA: O médico patologista envolvido no trabalho é o próprio Ricardo Artigiani Neto, chefe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital São Paulo - UNIFESP/EPM, e co-orientador da pesquisa.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

3- Em relação ao pedido de dispensa de TCLE: a dispensa foi solicitada, com a justificativa de se tratar de análise retrospectiva de prontuários e de blocos de parafina. Entretanto, por orientação da CONEP, é considerado que a análise de prontuários ou qualquer material biológicos não desobriga o pedido de TCLE, o qual deve ser aplicado no sentido de pedir autorização para o seu acesso, já que o prontuário/amostras biológicas é de propriedade do paciente e não do médico ou do pesquisador. Uma dispensa de TCLE só é aceita, no caso de não ser possível entrar em contato com o paciente (prontuários muitos antigos, impossibilidade de contatar o paciente, paciente Já falecido, etc.). Se este for o caso, favor dar esta justificativa no pedido de dispensa. Se este não for o caso (pacientes operados em junho de 2017 não estariam ainda em acompanhamento no ambulatório?), favor enviar modelo de TCLE a ser aplicado aos participantes, solicitando autorização para o acesso ao prontuário e utilização das amostras biológicas nesta pesquisa.

RESPOSTA: Compreendo a questão e encaminho em anexo o Termo de Consentimento Livre e

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55

Bairro: VILA CLEMENTINO

CEP: 04.020-060

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)5571-1062

Fax: (11)5539-7162

E-mail: cep@unifesp.edu.br



Continuação do Parecer: 2.317.761

Esclarecido (TCLE) que será aplicado aos pacientes que mantém acompanhamento nos ambulatórios do Setor de Laringologia e Voz do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da UNIFESP-EPM. Solicito, porém, dispensa da aplicação do TCLE para aqueles pacientes que não seja possível entrar em contato por perda de seguimento (morte, abandono de tratamento, alta de tratamento). A maioria dos pacientes do grupo de estudo (pacientes com câncer invasivo de laringe) mantém acompanhamento regular no ambulatório, porém uma parcela expressiva dos pacientes do grupo controle (pólipo de laringe), por se tratar de lesão benigna, recebem alta ambulatorial pouco tempo após a cirurgia e muitos deles são provenientes inclusive de outros estados do Brasil, o que dificultará o contato com esses pacientes. Dessa forma, comprometo-me a entrar em contato com todos os pacientes a fim de solicitar o TCLE, no entanto reitero a solicitação de dispensa do termo apenas nos casos de não ser possível tal contato.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (anualmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Lembramos que é de responsabilidade do pesquisador assegurar que o local onde a pesquisa será realizada ofereça condições plenas de funcionamento garantindo assim a segurança e o bem estar dos participantes da pesquisa e de quaisquer outros envolvidos .

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_971748.pdf	26/09/2017 21:34:04		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Termo_de_consentimento_HPV_CA_laringe.docx	26/09/2017 21:33:17	Gustavo Barreto da Cunha	Aceito
Outros	Resposta_de_Parecer.docx	26/09/2017 21:30:49	Gustavo Barreto da Cunha	Aceito
Outros	Autorizacao_patologia.pdf	26/09/2017 21:29:37	Gustavo Barreto da Cunha	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_HPV_CA_laringe.docx	09/08/2017 21:45:56	Gustavo Barreto da Cunha	Aceito

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO CEP: 04.020-050
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 Fax: (11)5539-7162 E-mail: cep@unifesp.edu.br



UNIFESP - HOSPITAL SÃO
PAULO - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO DA



Continuação do Parecer: 2.317.761

Investigador	Projeto_HPV_CA_laringe.docx	09/08/2017 21:45:56	Gustavo Barreto da Cunha	Aceito
Outros	Comite_de_Etica.pdf	09/08/2017 21:42:43	Gustavo Barreto da Cunha	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Oficio_diretoria.pdf	09/08/2017 21:42:11	Gustavo Barreto da Cunha	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	09/08/2017 21:41:49	Gustavo Barreto da Cunha	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 05 de Outubro de 2017

Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador)

Endereço: Rua Francisco de Castro, 55
Bairro: VILA CLEMENTINO **CEP:** 04.020-060
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)5571-1062 **Fax:** (11)5539-7162 **E-mail:** cep@unifesp.edu.br

Bibliografia consultada

Normas para teses e dissertações [Internet]. 2a ed. rev. e corrigida. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, Biblioteca Antônio Rubino de Azevedo, Coordenação de Cursos; 2015 [cited 2018 Oct 30]. Available from: <http://www.bibliotecacsp.unifesp.br/Documentos-Apostila/normas-para-teses-e-dissertacoes>