



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

DORA GABRIELA ANTUNES CORREIA

RELAÇÃO ENTRE O PAPILOMA VÍRUS HUMANO E TUMORES DA CABEÇA E PESCOÇO

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE ONCOLOGIA MÉDICA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
DR. NUNO ALEXANDRE ANTUNES BONITO
DR. JORGE MIGUEL EVA MIGUÉIS**

FEVEREIRO / 2011



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

DORA GABRIELA ANTUNES CORREIA

RELAÇÃO ENTRE O PAPILOMA VÍRUS HUMANO E TUMORES DA CABEÇA E PESCOÇO

ARTIGO CIENTÍFICO

ÁREA CIENTÍFICA DE ONCOLOGIA MÉDICA

TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:

DR. NUNO ALEXANDRE ANTUNES BONITO

Assistente Hospitalar Especialista em Oncologia Médica

| Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, E.P.E. |

DR. JORGE MIGUEL EVA MIGUÉIS

Assistente Hospitalar Graduado em Otorrinolaringologia

| Hospitais da Universidade de Coimbra, E.P.E. |

FEVEREIRO / 2011

*À minha Família,
pela ajuda, paciência e apoio incondicionais.*

*Aos meus Amigos,
pela preocupação, solidariedade e motivação.*

*Ao Florian,
pela força, carinho e compreensão.*

“This is not the end. It is not even the beginning of the end. But it is
perhaps the end of the beginning.”

Winston Churchill.



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

***RELAÇÃO ENTRE O PAPILOMA VÍRUS HUMANO
E
TUMORES DA CABEÇA E PESCOÇO***

Autores:

Dora Gabriela Antunes Correia - *Aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina*

Nuno Alexandre Antunes Bonito - *Assistente Hospitalar Especialista em Oncologia Médica*

Hugo João Marques Prazeres - *Técnico Superior de Saúde do Laboratório de Patologia Molecular*

Eugénia Cruz - *Assistente Hospitalar Graduada em Anatomia Patológica*

Miguel Costa - *Médico Dentista*

Teresa Martins - *Directora do Laboratório de Patologia Molecular*

Arnaldo Guimarães - *Director de Serviço de Otorrinolaringologia*

Maria Manuela Lacerda - *Directora de Serviço de Anatomia Patológica*

Regina Silva - *Assistente Hospitalar Graduada em Oncologia Médica*

Maria Helena Gervásio - *Directora de Serviço de Oncologia Médica*

Endereço:

doracorreia@gmail.com



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

RESUMO

Introdução

O Papiloma Vírus Humano (HPV) desempenha um papel ainda desconhecido nalguns tumores da cabeça e pescoço (CP). Sabemos, no entanto, que alguns estudos evidenciaram uma representatividade de cerca de 25% no que diz respeito à sua detecção nos tumores espinhocelulares. Sabemos ainda, que a maioria dos tumores HPV positivos estão localizados na orofaringe e que estes ocorrem menos frequentemente entre a população fumadora e com hábitos etílicos marcados, o que lhes confere uma sobrevivência específica. A biologia de cancro orofaríngeo HPV-positivo distingue-se do relacionado com o tabaco, pelo que devem ser considerados uma entidade clínica e patológica distinta.

Syrjänen faz a primeira referência à relação do HPV com os tumores da CP, tendo em conta a semelhança da mucosa oral e genital. Esta correlação leva-nos a pensar que poderão existir formas de prevenir este tipo de tumor, podendo a vacinação ser também implementada.

Este tema é ainda actualmente controverso, faltando alguns dados para definir o papel preditivo e prognóstico do HPV como factor independente de risco.

Objectivo

Avaliar a relação entre o HPV e os tumores espinhocelulares da CP.

Metodologia

Foi escolhida uma população de doentes com tumores espinhocelulares da CP com estudo histológico confirmatório, do Instituto Português de Oncologia Coimbra Francisco Gentil. Foram-nos referenciados os doentes pelos serviços de Estomatologia e de Otorrinolaringologia e, posteriormente avaliados, no serviço de Oncologia Médica, onde foram pedidos os estudos por PCR ao serviço de Patologia Molecular. Após a elaboração de uma história clínica detalhada, tendo particular atenção ao estilo de vida do doente, foram excluídos os doentes com hábitos tabágicos e alcoólicos marcados e pesquisado o DNA do HPV no estudo histológico, através de método de PCR, com conseqüente tipificação. O estudo foi realizado no período que mediu Maio de 2010 e Janeiro de 2011.

Resultados e Conclusões

Segundo a metodologia apresentada, foram avaliados 18 doentes, em regime de consulta externa no Serviço de Oncologia Médica. A média de idades foi de 63 anos com 61% do sexo



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

masculino e 39% do sexo feminino. 16,5% dos doentes foram positivos para HPV com 5,5% de positividade para cada subtipo de HPV (81, 31 e 16). 75% dos doentes que se revelaram positivos para HPV apresentaram-se com localização preferencial na língua e em estágio III e 25% dos doentes a nível da laringe e em estágio II. 75% dos doentes HPV positivos estão a ser submetidos a terapêutica concomitante com radioterapia e anti-EGFR. Não foi encontrada qualquer correlação entre os doentes HPV positivos e promiscuidade sexual ou doenças sexualmente transmissíveis.

PALAVRAS-CHAVE

Papiloma Vírus Humano; Tumores da Cabeça e Pescoço; Tumores Espinhocelulares; *Polymerase Chain Reaction*; Doença Sexualmente Transmissível; Orofaringe; Tabaco; Álcool



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

ABSTRACT

Introduction

The Human Papillomavirus (HPV) still plays an unknown role in some head and neck tumours. However, some studies have shown an incidence of about 25% in squamous cell tumours. We also know that the majority of HPV-positive tumours are located in the oropharynx and that they occur less frequently among the smoking population and those with alcohol abuse habits, which gives them a specific survival. The biology of HPV-positive oropharyngeal cancer is distinguished from the tobacco-related one and therefore they should be considered a distinct clinical and pathological entity.

Syrjänen makes the first reference to the relation between HPV and tumours of the head and neck, taking into account the similarity between the oral and genital mucosa. This correlation leads us to think that there may be ways to prevent this type of tumour, and that a vaccine can also be implemented.

This subject is still controversial, as sufficient data are not available to define the predictive and prognostic role of HPV as an independent risk factor.

Objective

Assess the relationship between HPV and head and neck squamous cell tumours.

Methodology

A number of patients with histological confirmation of head and neck squamous cell tumours, from the Portuguese Institute of Oncology Francisco Gentil in Coimbra, have been chosen. The patients have been referred by the Stomatology and Otolaryngology departments and subsequently evaluated at the department of Medical Oncology, where the PCR studies were requested from the Molecular Pathology department. After detailed medical history with particular attention to the patient lifestyle, we excluded patients with smoking and alcohol consumption habits and searched the HPV DNA in the histological study, using PCR. We evaluated the patients between May 2010 and January 2011.

Results and Conclusions

According to the Methodology, 18 patients have been evaluated at the Department of Medical Oncology. The average age was 63 years, 61% being male and 39% female. 16.5% of the



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

patients were positive for HPV with positivity of 5.5% for each subtype of HPV (81, 31 and 16). 75% of the patients who showed being positive for HPV presented a preferential anatomic site in the tongue and in stage III, and 25% of the patients within the larynx and in stage II. 75% of HPV-positive patients are undergoing concurrent therapy with radiotherapy and anti-EGFR. No correlation between HPV-positive patients and sexual promiscuity and sexually transmitted diseases has been found.

KEYWORDS

Human Papillomavirus; Head and Neck Tumours; Squamous Cell Tumours; Polymerase Chain Reaction; Sexually Transmitted Diseases; Oropharynx; Tobacco, Alcohol.



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Lista de Abreviaturas

CP – Cabeça e Pescoço

EBV – Epstein-Barr Vírus

EGFR – Receptor do Factor de Crescimento Epidérmico

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HPV – Papiloma Vírus Humano

PCR – *Polymerase Chain Reaction*



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.....	2
MATERIAIS E MÉTODOS.....	4
RESULTADOS.....	11
DISCUSSÃO.....	15
REFERÊNCIAS / BIBLIOGRAFIA	18
AGRADECIMENTOS.....	21
ANEXOS	22
ANEXO 1 – Comissão de Ética	
ANEXO 2 – Autorização do Conselho de Administração	
ANEXO 3 – Consentimento Informado	
ANEXO 4 – Autorizações dos Serviços intervenientes no Estudo	
ANEXO 5 – Modelo de História Clínica	



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

INTRODUÇÃO

Os papilomavírus pertencem à família de Papovírus e usam os organismos animais para desenvolverem o seu ciclo de vida e se replicarem. Têm uma afinidade natural para células epiteliais, quer cutâneas, quer das zonas mucosas, e induzem a formação de tumores, ou papilomas, para fomentarem a sua própria replicação. Têm a capacidade de se manterem associados ao hospedeiro durante longos períodos de tempo, causando infecções persistentes. No entanto, os efeitos não costumam ser graves para o organismo pois, por um lado, a infecção mantém-se localizada e, por outro, os tecidos infectados estão continuamente a ser regenerados, ao mesmo tempo que as células danificadas vão sendo eliminadas (Park & Androphy, 2002; Wagner & Hewlett, 2004).

Apesar do reconhecimento da importância do Papiloma Vírus Humano (HPV) em vários tumores, a epidemiologia da infecção oral de HPV ainda não é bem entendida. Ainda não é sabido se a história natural do HPV oral ou se os factores de risco para infecção persistente de HPV na orofaringe diferem daqueles conhecidos para a infecção por HPV anogenital. Contudo, vários estudos sugerem que a infecção por HPV oral seja sexualmente adquirida.

Apesar de há muito se saber que o HPV é uma causa importante de cancro anogenital, só recentemente foi reconhecido como um agente causal dos tumores espinhocelulares da cabeça e pescoço (CP) (D'Souza *et al.*, 2007). Parece existir umnexo de causalidade relativamente ao HPV 16 e 18, não se excluindo outros subtipos. No entanto, a sua prevalência global e o tipo de distribuição permanece pouco clara. O HPV 16 é o tipo de HPV de alto risco mais comum, mas podem ser detectadas variantes de HPV 16 na população mundial com prevalências distintas. O significado clínico e virológico das variantes permanecem desconhecidos (Silva *et al.*, 2007). De acordo com A-Awadhi (2011), os subtipos podem ser classificados da seguinte forma: HPV de alto risco (16, 31, 33, 53, 56, 58, 66, e 73), baixo-risco (6, 11, 54, 61, 70, 81, e 90) e de risco intermédio (67, 82, 83 e 84).

O cancro da CP é o sexto tipo de cancro mais comum a nível mundial (Parkin *et al.*, 2005). A incidência do carcinoma espinhocelular tem aumentado gradualmente nas últimas três décadas, sendo já a sexta causa de morte por cancro a nível mundial (Goon *et al.*, 2009).

O tipo histológico mais comum dos tumores da CP é o carcinoma espinhocelular, havendo nos últimos anos um aumento de incidência a nível orofaríngeo (Marur *et al.*, 2010). O uso de



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

tabaco tem diminuído nas últimas décadas, e o correspondente aumento proporcional de cancro da CP com origem orofaríngea tem sido marcante a nível internacional (Shiboski *et al.*, 2005). Há vários dados que apontam que o HPV é actualmente a causa primária deste tipo de tumores na América do Norte e Europa. O aumento da incidência de cancro orofaríngeo associado a HPV representa, portanto, uma epidemia emergente de cancro viral (Marur *et al.*, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2007), existem mais de 100 tipos diferentes de HPV e pensa-se que pelo menos 15 tipos têm potencial oncogénico (Muñoz *et al.*, 2003). Contudo, a maioria (mais de 90%) são causados pelo de tipo 16 – o mesmo que leva a cancro anogenital associado a HPV (Marur *et al.*, 2010).

O aparecimento de novos casos em doentes jovens que afirmam nunca ter fumado ou consumido álcool faz-nos acreditar que há, sem dúvida, outros factores de risco a ter em conta. O tabaco e o álcool desempenham um factor etiológico importante, sendo o efeito combinado multiplicativo, em vez de aditivo. Também as infecções virais causadas pelos vírus da imunodeficiência humana (HIV) e Epstein-Barr (EBV) poderão ter relação na etiologia deste tipo de entidade patológica, sempre em correlação directa com o *status* genético do indivíduo (Mendenhall *et al.*, 2008).

Apesar do reconhecimento da importância do HPV em vários tumores orofaríngeos, ainda há vários pontos que precisam de ser aprofundados, nomeadamente o processo carcinogénico, o risco epidemiológico e a consequente correlação com a história natural de infecção por HPV. Por exemplo, ainda não é sabido se a história natural do HPV orofaríngeo ou se os factores de risco conhecidos para infecção persistente diferem dos já conhecidos para a infecção por anogenital (Marur *et al.*, 2010).

Por ser premente entender o papel do HPV na génese dos tumores da CP e ainda existirem lacunas na evidência causal relativamente à presença do seu DNA em fragmentos de tecido neoplásico, este estudo visa investigar a relação entre o HPV e os tumores da CP.



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção de Doentes

Foi seleccionada uma população de doentes com tumores da cabeça e pescoço com estudo histológico confirmatório, do Instituto Português de Oncologia Coimbra Francisco Gentil. O estudo foi previamente submetido e aceite pela Comissão de Ética e Conselho de Administração da instituição (Anexo 1 e 2). Os doentes foram-nos referenciados pelos serviços de Estomatologia e de Otorrinolaringologia e, posteriormente, avaliados no serviço de Oncologia Médica, onde foram pedidos estudos de detecção e tipificação de HPV ao serviço de Patologia Molecular (Anexo 4). Após a elaboração de uma história clínica detalhada (Anexo 5), tendo particular atenção ao estilo de vida do doente, foram excluídos os doentes com hábitos tabágicos e alcoólicos marcados e pesquisado o DNA do HPV no estudo histológico, através de método de PCR. Todos os doentes assinaram consentimento informado (Anexo 3).

Extracção de DNA de tecidos biológicos (incluídos em Parafina)

1. Colheita de tecido

Para fazer a colheita do tecido incluído em parafina, cortaram-se secções de tecido com 10µm de espessura no micrótomo (Microm Heidelberg HM350). Para tal, lavou-se o micrótomo, de início e entre cada amostra, com o *spray* de limpeza “Tissue-Tek” (Para-Clear de 125mL), usando uma lâmina nova para cada amostra, de modo a evitar contaminação com as amostras anteriores. Com base no tamanho da biópsia, 3 a 9 cortes de cada amostra foram colocados num tubo de 1,5ml devidamente esterelizado e rotulado. Recomenda-se o uso de um controlo negativo para a presença de DNA do HPV a cada 10 amostras.

2. Digestão do tecido

Ao sedimento de tecido adicionou-se um tampão de digestão (0,5% (w/v) de detergente SDS em tampão de lise (3M NaCl, 100 mM EDTA e 100mM Tris HCL pH 7,5), juntamente com Proteinase K (a uma concentração final de 0,5mg/mL) e água destilada, de forma a perfazer um volume final de 500µl para cada tubo. Depois de agitadas, as amostras foram



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

incubadas a 56°C, durante a noite, em banho termostatzado (incubadora Hetotherm BWO), para ocorrer digestão completa do tecido.

3. Extracção do DNA com Fenol/ Clorofórmio

Para extrair o DNA das amostras biológicas, os tubos foram centrifugados (Centrifuge Eppendorf 5810R) durante 5 minutos, de forma a formar duas fases, uma constituída pela parafina e, debaixo desta, pela camada aquosa a ser pipetada para um novo tubo.

Após as amostras terem arrefecido à temperatura ambiente, foi adicionado, na hote, 1 volume (500µl) de fenol-clorofórmio-ácido isoamílico (24:1:1; Sigma-Aldrich) a cada tubo e agitou-se suavemente, invertendo várias vezes o tubo durante 10 minutos. De seguida, após 5 minutos de centrifugação à temperatura ambiente, as fases líquidas ficaram separadas. Obteve-se uma fase orgânica inferior de fenol, uma interface branca floclulenta e uma fase aquosa superior, contendo os ácidos nucleicos. Recolheu-se cerca de 90% da fase aquosa para um tubo novo, com o cuidado de não interferir com a interface, de modo a evitar a contaminação com proteínas. Os passos anteriores foram repetidos (duas vezes), até a interface ficar limpa.

Adicionou-se 1 volume (500µl) de clorofórmio (Pronalab) em cada tubo e misturou-se, invertendo o tubo durante 5 minutos. Centrifugou-se 5 minutos à temperatura ambiente e recolheu-se a fase aquosa num tubo novo.

4. Precipitação do DNA

O DNA foi precipitado adicionando 1/10 de volume de acetato de sódio (3M, pH 5,2) e 2 volumes de etanol absoluto frio (-20°C). Após misturar bem, incubou-se a -70°C durante 30 minutos (ou durante a noite). O DNA forma um sal com o sódio, dando origem a um precipitado esbranquiçado, que se aglomera num *pellet* após centrifugação de 35 minutos (a 4°C e 11.500 rpm). Inutilizou-se o sobrenadante, com cuidado para não perturbar o *pellet* e lavou-se o sedimento, adicionando 500µl de etanol a 70% frio (-20°C) e agitou-se. Para ressedimentar o precipitado, centrifugou-se de novo, durante 30 minutos. Removeu-se o sobrenadante e deixou-se secar o sedimento à temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em água destilada e posteriormente armazenado a -20°C.



Amplificação de DNA por PCR

A reacção de PCR foi realizada em ciclos repetidos (automaticamente por um termociclador) de uma série de três temperaturas que definem três acontecimentos:

A) Desnaturação (a 94°C, dá-se a separação da cadeia dupla de DNA em cadeias simples, que vão funcionar como moldes na síntese de DNA);

B) “Annealing” (i.e. hibridização dos “primers” na região complementar do DNA molde, por emparelhamento de bases; a temperatura depende da composição de bases dos “primers”);

C) Extensão (a 72°C, a temperatura óptima de actividade da DNA polimerase utilizada na reacção; dá-se a replicação de DNA, pela síntese de novas cadeias complementares, a partir dos “primers”, no sentido 5’-3’).

A cada série de desnaturação-hibridização-extensão chama-se um ciclo de PCR, que resulta na acumulação exponencial de um fragmento específico de DNA, que pode ser observado por electroforese como uma banda distinta.

Devido ao risco de contaminação, foi criada uma área de trabalho estéril, com separação do material usado na técnica de PCR. Para tal, esterilizou-se a câmara de fluxo laminar, ligando a lâmpada de UV e o “blower” 15 minutos antes de usar, e calçaram-se luvas novas sempre que os reagentes de PCR foram manipulados.

Os reagentes de PCR (Taq Buffer, MgCl₂, Primers e dNTPs) foram retirados do frigorífico, deixados a descongelar e agitados vigorosamente para maximizar a sua recuperação. A Taq Polimerase (iTaq™ DNA Polymerase, Bio-Rad), sendo uma enzima, não deve atingir a temperatura ambiente, sendo retirada do congelador no momento anterior à sua adição e guardada imediatamente após o seu uso. No interior da câmara de fluxo laminar, as reacções de controlo foram planeadas na ausência de DNA e foi preparada, num tubo de 1,5 ml, uma mistura de reagentes para o número de reacções a realizar. Os volumes para cada reacção são dados na tabela I.



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Tabela I. Concentração e volumes dos reagentes de PCR por cada reacção (volume final: 25µl)

Reagente	Concentração Stock	Concentração Final	Volume (µl)
H ₂ O	-	-	*
MgCl ₂	50 mM	1,5 mM	3
Taq Buffer	10x	1x	2,5
d.NTPs	10 mM	200 µM	1
Primer GP5 ⁺ / MY09	20 µM	0,4 uM (10 p.moles)	0,5
Primer GP6 ⁺ / MY11	20 µM	0,4 uM (10 p.moles)	0,5
Taq Polimerase	5 U/µL	1,25 U	0,5
DNA molde	-	50-100 ng	0,5 – 1 – 2

* Adicionar o volume de H₂O necessário para perfazer um volume final de 25µl após a adição dos reagentes e da amostra de DNA.

De seguida, distribuiu-se a mistura por tubos de PCR de 0,2 ml numerados. Todos os reagentes foram retirados da área de trabalho e colocados no congelador, para evitar o risco de contaminação, e os tubos foram transferidos para uma área de trabalho independente, onde se adicionou o DNA da amostra.

Por fim, os tubos foram colocados no termociclador (iCycler, BioRad) com uma programação adequada aos “primers” utilizados (tabelas II e III).

Tabela II. Programa de PCR para os Primers GP5⁺/GP6⁺

Ciclo	Acontecimento	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
1x	A	95	9
16x	A	94	1
	B	55	2
	C	72	1,5
34x	A	94	1
	B	40	2



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

	C	72	1,5
1x	C'	72	4
1x	D	10	-
A – Desnaturação; B – “Annealing”; C – Extensão; C' – Extensão final; D – Manutenção.			

Tabela III. Programa de PCR “Nested” com os Primers MY09/MY11

Ciclo	Acontecimento	Temperatura (°C)	Tempo
1x	A	95	9 min
45x	A	94	50 s
	B	55	1 min
	C	72	1min 50s
1x	C'	72	8
1x	D	20	-
A – Desnaturação; B – “Annealing”; C – Extensão; C' – Extensão final; D – Manutenção.			

Electroforese de DNA em Gel de Agarose

A electroforese consiste na separação de biomoléculas e migração de acordo com a sua carga e massa, quando sujeitas à acção de um campo eléctrico. Este método, em gel de agarose, permite verificar se houve amplificação de DNA por PCR.

1. Preparação do gel

O gel de agarose é preparado por polimerização da agarose em tampão de electroforese, para evitar diferenças na força iónica entre o tampão e o gel, o que poderia resultar num aquecimento indesejado do gel. Preparou-se numa proveta de 200ml do tampão de electroforese TAE 1x (50mM Tris HCl pH8.0, 10% Ácido Acético, 10mM EDTA) a partir de um stock de TAE 50x. Num balão de Erlenmeyer, adicionou-se, ao volume de tampão necessário para encher o molde -200 ml-, a quantidade de agarose (SeaKem® LE Agarose, Lonza) necessária para obter uma concentração de 2% (w/v). Aqueceu-se no microondas



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

(potência 80W, durante cerca de 3 minutos), com agitação frequente, até a agarose se ter dissolvido, formando uma solução translúcida. Após se ter deixado arrefecer o gel até cerca de 60°C, durante 10 a 15 minutos, adicionou-se 4µl de corante fluorescente (GelStar®, “Nucleic Acid Gel Stain”, Lonza) no interior da hote e agitou-se para assegurar a sua distribuição uniforme pelo gel. A solução de agarose foi lentamente vertida num molde, de forma a não se formarem bolhas de ar, e foi colocado um pente que formou os poços para a aplicação das amostras. Ao arrefecer, durante cerca de 30 minutos, a agarose polimerizou formando um gel.

2. Aplicação das amostras

Colocou-se o gel no aparelho da electroforese, com tampão suficiente até preencher as câmaras dos eléctrodos e cobri-lo com uma profundidade de aproximadamente 1mm. Só depois de o gel estar submerso em tampão, se retirou cuidadosamente o pente de forma a não o estalar.

Sobre a face limpa de uma tira de parafilm, adicionou-se 2µl de produtos de PCR, *Loading Buffer* (stock 5x; glicerol 50% (v/v) e bromoferol azul e xileno de cianol a 0,25% (w/v)), para que as amostras se tornem densas e visíveis, permitindo a monitorização da migração da electroforese. Preparou-se igualmente uma mistura de 1µl de um marcador de pesos moleculares de DNA (pUC19, Fermentas), 2µl de *Loading Buffer* e 7µl de água e aplicou-se a amostra no poço do gel. Colocou-se a tampa do aparelho de electroforese (BioRad), ligando os seus eléctrodos à fonte de alimentação e deixou-se correr a electroforese a 170V durante cerca de 30 minutos, monitorizando a migração dos corantes.

3. Visualização e Registo

Primeiro certificou-se que a fonte de alimentação estava desligada, antes de se manipular o gel. Após a electroforese, retirou-se o gel do aparelho com o cuidado de não o danificar. Colocou-se no transiluminador (Vilber Lourmat), fechou-se o filtro de U.V., ligou-se a fonte de U.V. (100%) e visualizaram-se as bandas de DNA fluorescentes.



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Tratamento das Amostras Positivas

Às amostras que, durante a electroforese, se revelaram positivas para HPV, adicionou-se 1µl de SAP (“Shrimp Alkaline Phosphatase”, Fermentas) e 0,5µl de Exonuclease I (Fermentas). As amostras foram incubadas durante 30 minutos, a 37°C e durante 20 minutos, a 80°C. Prosseguiu-se para o protocolo de sequenciação de DNA, após precipitação.

Precipitação de DNA

Para preparar o DNA de modo a ser sequenciado, é necessário precipitá-lo primeiro. Para tal, adicionou-se 1/10 de acetato de sódio (4µl), seguido de etanol frio (100µl a 100%), agitou-se e manteve-se durante 30 minutos (ou durante a noite) a -70°C.

As amostras foram centrifugadas durante 35 minutos, a 4°C, a 11.500 rpm. Verteu-se o líquido em papel, virando os tubos para baixo, adicionaram-se 500µl de etanol a 70% e voltou-se a centrifugar, por 30 minutos. Após verter o líquido, deixou-se secar virado para baixo em papel.

Sequenciação do DNA

O DNA foi sequenciado no laboratório “MWG Eurofins Sequencing Facility”.

As sequências obtidas foram de seguida analisadas através da ferramenta bioinformática, BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*), no website <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> e do programa informático CHROMAS 2.33 (Technelysium Pty. Ltd).

Análise Estatística

Dada a pequena amostra encontrada, a análise estatística foi feita com recurso a folha de cálculo do programa “Microsoft® Excel® 2008 version 12.2.8”.



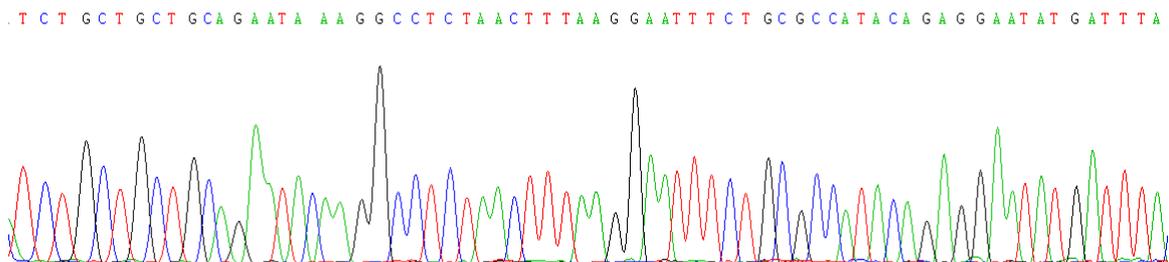
RESULTADOS

Foram avaliados 18 doentes com uma média de idades de 63 anos. 61% eram do sexo masculino e 39% do sexo feminino. No que concerne à localização anatómica: 50% na língua, 22,2% a nível faringo-laríngeo, 11,1% a nível da nasofaringe, 11,1% a nível do lábio inferior e 5,6% no rebordo alveolar. Relativamente ao estágio inicial: 38,9% em estágio II, 38,9% em estágio III, 16,7% em estágio I e 5,5% em estágio IV. 72,2% dos doentes foram submetidos a cirurgia. 11,1 % dos doentes referiram história prévia de doenças sexualmente transmissíveis e 33,3% admitiram hábitos sexuais prosmícuos. 16,5% dos doentes foram positivos para HPV com 5,5% de positividade para cada subtipo de HPV (81, 31 e 16): a média de idade destes doentes foi de 66 anos e 75% eram do sexo masculino. 75% dos doentes que se revelaram positivos para HPV apresentaram-se com localização preferencial na língua (HPV16 e HPV31) e em estágio III e 25% dos doentes a nível da laringe (HPV81) e em estágio II. 75% dos doentes HPV positivos estão a ser submetidos a terapêutica concomitante com radioterapia e anti-EGFR (HPV81 e HPV16). Não foi encontrada qualquer correlação entre os doentes HPV positivos e promiscuidade sexual ou doenças sexualmente transmissíveis. Todos os doentes estão vivos.

Sequenciação de HPV

1. Amostra 2 – HPV 81 (figura 1);
2. Amostra 10 – HPV 31 (figura 2);
3. Amostra 23 – HPV 16 (figura 3).

1-A

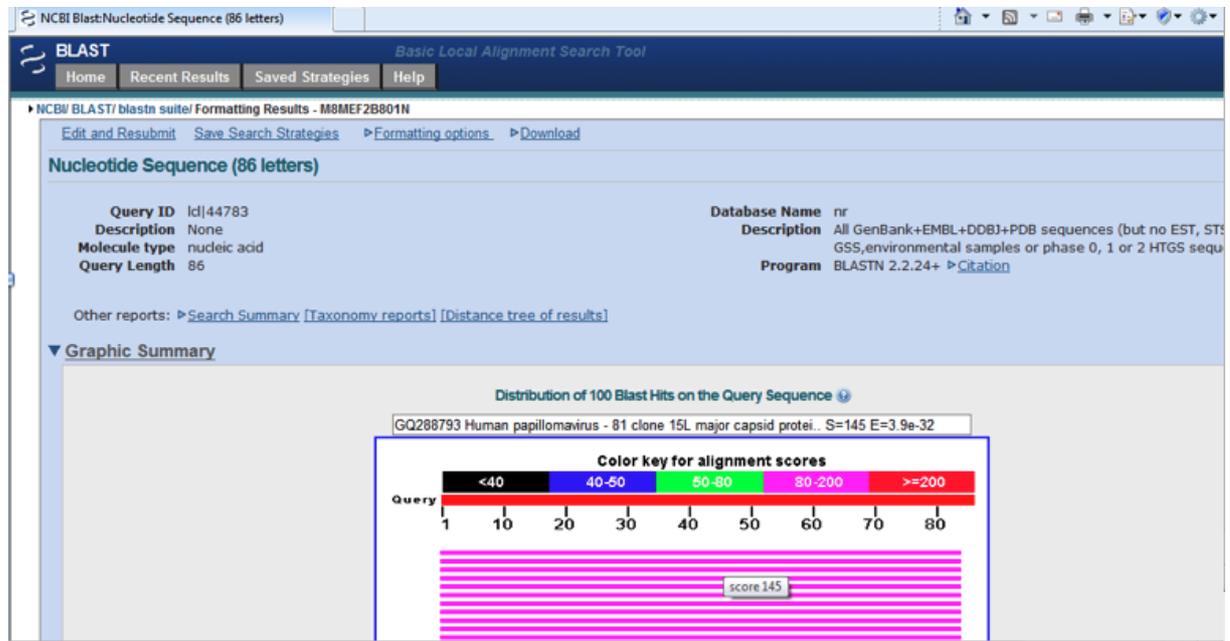




TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

1-B



1-C

```
> qb|GQ288793.1 Human papillomavirus - 81 clone 15L major capsid protein L1 (L1)
gene, complete cds
Length=1599

Score = 152 bits (82), Expect = 2e-34
Identities = 84/85 (99%), Gaps = 0/85 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 1 CTACATCTGCTGCTGCAGAATACAGGCCTCTAACTTTAAGGAATTTCTGCGCCATACAG 60
      |||
Sbjct 1130 CTACATCTGCTGCTGCAGAATACAGGCCTCTAACTTTAAGGAATTTCTGCGCCATACAG 1189

Query 61 AGGAATATGATTTACAGTTTATTTT 85
      |||
Sbjct 1190 AGGAATATGATTTGCACTTTATTTT 1214
```

Figura 1-A. Padrão de sequenciação de HPV 81 – Programa CHROMAS 2.33;

1-B. Distribuição de nucleótidos em HPV de tipo 81- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

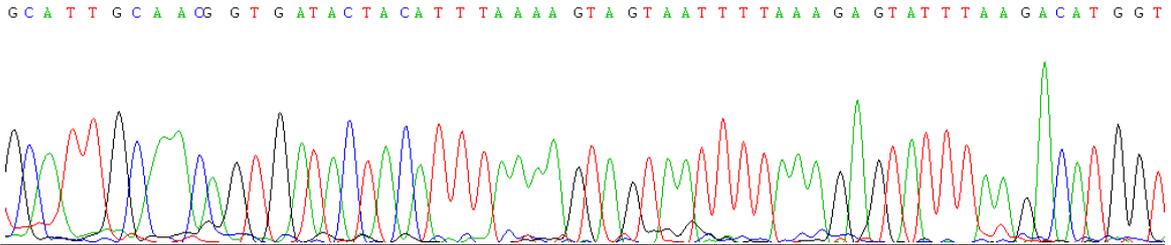
1-C. Sequência de nucleótidos para o tipo de HPV 81-<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.



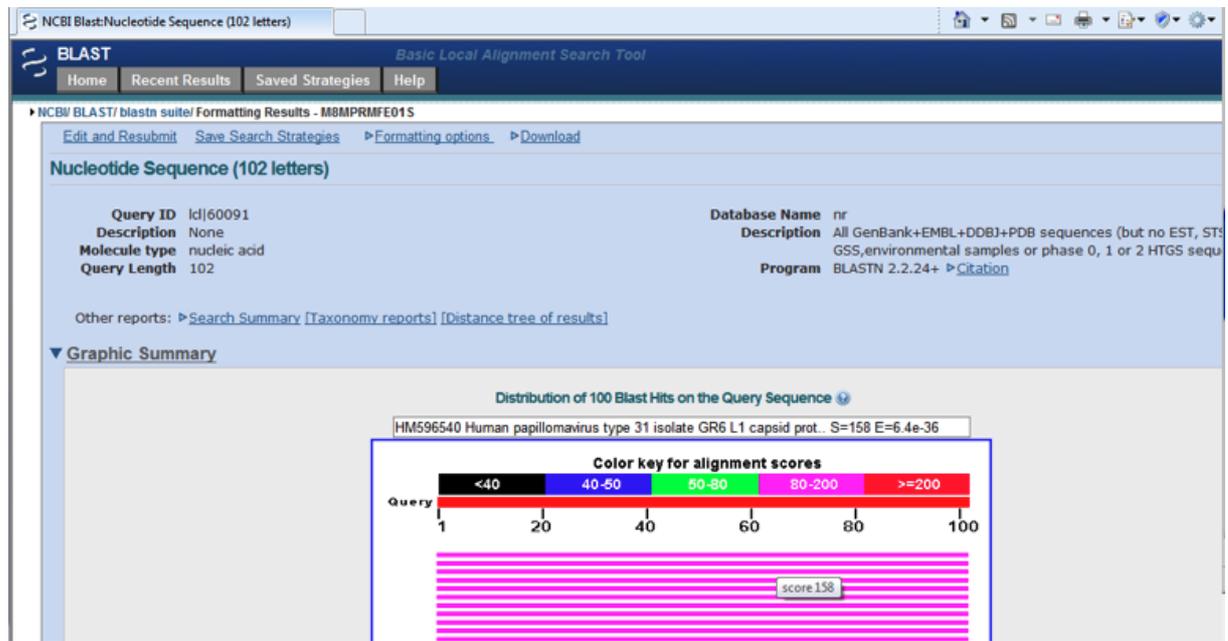
TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

2-A



2-B



2-C

```

> NCBI Blast:Nucleotide Sequence (102 letters) type 31 isolate GR6 L1 capsid protein gene,
part: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#310788241
Length=104

Score = 158 bits (85), Expect = 6e-36
Identities = 98/104 (95%), Gaps = 2/104 (1%)
Strand=Plus/Plus

Query 1   GTCTGTGTGTGCTGC-ATTGC-AACGGTGATACTACATTTAAAAGTAGTAATTTTAAAGA 58
          |||
Sbjct 72   GTCTGTGTGTGCTGCAATTGCAACAGTGATACTACATTTAAAAGTAGTAATTTTAAAGA 131

Query 59  GTATTTAAGACATGGTGAGGAATATGATTTACAGTTTATTTTC 102
          |||
Sbjct 132  GTATTTAAGACATGGTGAGGAATTTGATTTACAATTTATATTC 175
  
```

Figura 2-A. Padrão de sequenciação de HPV 81 – Programa CHROMAS 2.33;

2-B. Distribuição de nucleótidos em HPV de tipo 81- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

2-C. Sequência de nucleótidos para o tipo de HPV 81-<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

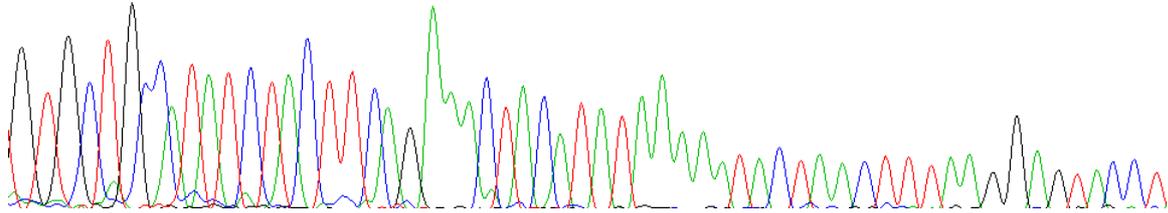


TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

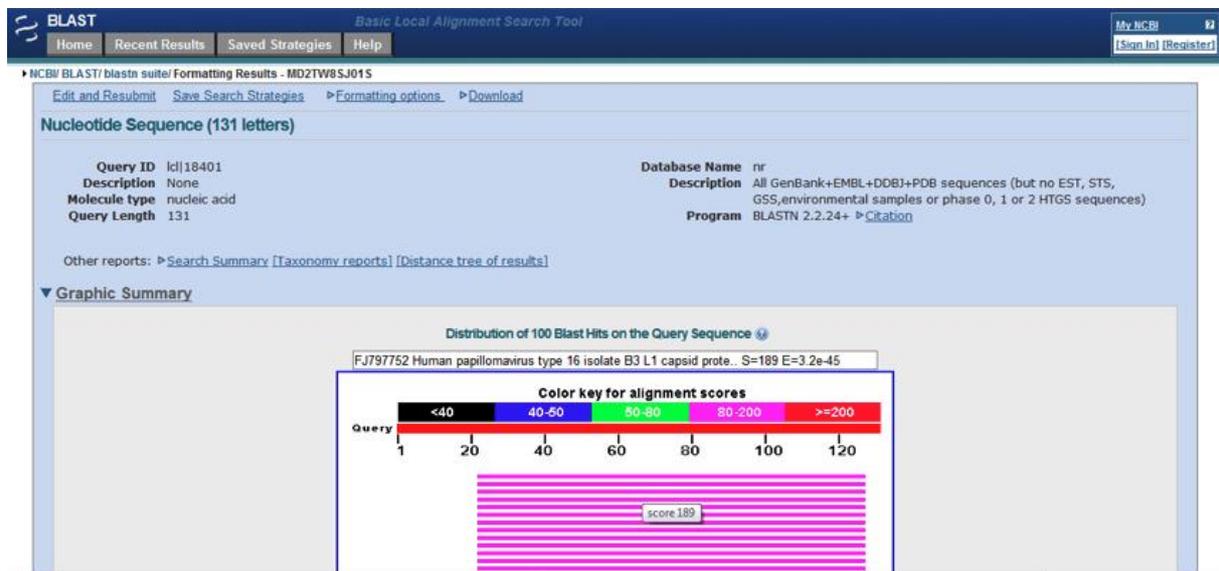
Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

3-A

G T G C T G C C A T A T C T A C T T C A G A A A C T A C A T A T A A A A A T A C T A A C T T T A A G G A G T A C C T



3-B



3-C

```
> gb|FJ797752.1 Human papillomavirus type 16 isolate B3 L1 capsid protein gene,
partial cds
Length=400

Score = 189 bits (102), Expect = 3e-45
Identities = 105/106 (99%), Gaps = 1/106 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 23 TGT-ATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGG 81
      ||| |
Sbjct 60 TGTCATTATGTGCTGCCATATCTACTTCAGAACTACATATAAAAATACTAACTTTAAGG 119

Query 82 AGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAGTTTATTTTCA 127
      ||| |
Sbjct 120 AGTACCTACGACATGGGGAGGAATATGATTACAGTTTATTTTCA 165
```

Figura 3-A. Padrão de sequenciação de HPV 81 – Programa CHROMAS 2.33;

3-B. Distribuição de nucleótidos em HPV de tipo 81- <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.

3-C. Sequência de nucleótidos para o tipo de HPV 81-<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>.



DISCUSSÃO

O HPV 6 e 11 são os subtipos virais mais frequentemente associados a lesões benignas, enquanto que o HPV 16 e 18 foram encontrados em lesões pré-malignas como leucoplasia e eritroplasia. Estes dois últimos subtipos são os mais comuns em carcinomas orofaríngeos, com taxas de 22% e 14%, respectivamente, o que não se constatou no nosso estudo, dado que a localização preferencial foi a língua. Considera-se que a presença de infecção por HPV 16 e 18 na base da língua possa aumentar 3 a 5 vezes o risco de desenvolver carcinoma. De 1980 a 2002, estudos concluíram que 12,4% dos carcinomas eram positivos para HPV. Alguns estudos detectaram DNA HPV tanto na lesão primária, como na metastização cervical. Relativamente a localizações não específicas da CP, a presença de HPV varia de 2,1 a 60% (Mendenhall *et al.*, 2008).

A biologia de cancro orofaríngeo HPV-positivo distingue-se pela degradação de P53, inactivação da via do retinoblastoma RB e regulação positiva de P16. Por sua vez, o cancro orofaríngeo relacionado com tabaco é caracterizado por mutação de TP53 e regulação negativa de CDKN2A (que codifica P16). Parece, portanto, que os tumores da orofaringe, HPV positivos, devem ser considerados uma entidade clínica e patológica distinta.

Apesar de a hibridização *in situ* do HPV ou de a amplificação do DNA por PCR poderem servir como pontos de partida para a análise universal e de rotina de cancro orofaríngeo, a detecção de apenas HPV pode não explorar todo o seu potencial como biomarcador. No nosso estudo não foi possível fazer a determinação do DNA do HPV em fluidos periféricos por limitação laboratorial, o que pode promover algum enviesamento nos resultados.

Uma maior compreensão da carcinogénese induzida por HPV – incluindo a complexa interacção entre a infecção por HPV e vias genéticas e moleculares – vai levar inevitavelmente à execução de ensaios cada vez mais elaborados e completos. Mutações de TP53 (Westra *et al.*, 2008), expressão aberrante de BCL2 (Michaud *et al.*, 2009), sobreexpressão do EGFR (Kumar *et al.*, 2008) e outros distúrbios, podem agir, individualmente ou em conjunto, para modular o efeito prognóstico da detecção do HPV. É, portanto, necessário um perfil mais aprofundado dos biomarcadores, juntamente com a análise de HPV (Marur *et al.*, 2010). Além disso, a constatação de que as respostas terapêuticas se podem correlacionar com o número de cópias do HPV sugere um papel futuro



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

para a medição quantitativa da carga viral (Kumar *et al.*, 2008).

Mais de 90% dos cancros da cabeça e pescoço expressam EGFR, e a expressão elevada de EGFR e o número de cópias do gene EGFR está associado a um prognóstico reservado (Chung *et al.*, 2006). Sabe-se, no entanto, por estudos prévios que um anticorpo de rato IgG1 anti-EGFR humanizado melhorou o controlo loco-regional e a sobrevivência global em combinação com radioterapia em tumores localmente avançados, mas com o custo de algum aumento da morbilidade cardíaca e da mortalidade. A melhoria do prognóstico apresentada e a resposta ao tratamento com quimioterapia e radioterapia em tumores HPV positivos, sugere que a detecção do tipo de HPV possa ser necessária para planear e individualizar os regimes terapêuticos de cada doente (Goon *et al.*, 2009). Segundo Schilsky (2009), é possível que os doentes com tumores da CP HPV positivos possam apresentar um índice de prioridade diferente relativamente ao início do tratamento. A sensibilidade aumentada à quimioterapia e radioterapia tem sido atribuída à ausência de exposição ao tabaco e à presença não mutada de TP53 funcional (Butz & Bristow, 1996; Dahm-Daphi, 2000). O aumento da sobrevivência de doentes com cancro HPV-positivo também pode ser atribuível, em parte, à ausência de processo carcinogénico relacionado com o tabaco e a ingestão de álcool (Gillison *et al.*, 2000). Tumores HPV-positivos são mais sensíveis à quimioterapia citotóxica e à apoptose induzida por danos no DNA, secundária à incorporação da oncoproteínas virais E6 e E7 (Liu *et al.*, 2000, 2008). Estes dados indicam claramente que a exposição ao tabaco altera a biologia dos tumores orofaríngeos HPV-positivos e é um importante factor de prognóstico (Marur *et al.*, 2010).

Os resultados de análises retrospectivas em indivíduos com cancro orofaríngeo HPV-positivo não diferem dos resultados apresentados pelos autores, não se tendo conseguido provar nexos de causalidade entre os hábitos sexuais promíscuos e doenças sexualmente transmissíveis, com infecção por HPV. Também não nos é possível aferir, de momento, relativamente à resposta aos tratamentos instituídos e ao prognóstico da doença, em doentes HPV positivos.

O alargamento da detecção de HPV no sangue e em outros fluídos corporais destacaria o papel do HPV como biomarcador clinicamente relevante, mas seriam necessárias outras plataformas de detecção. A detecção de HPV DNA em sangue (Smith *et al.*, 2008) e saliva (Capone *et al.*, 2000) de doentes após tratamento de cancro HPV-positivo sugere um papel



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

futuro na vigilância tumoral. A detecção de anticorpos séricos relacionados com HPV pode prever o tipo de HPV de tumores da cabeça e pescoço e permitir a caracterização molecular detalhada das vias de sinalização antes da terapêutica. Existe agora a oportunidade de investigar estratégias de tratamento menos intenso, de modo a não comprometer os resultados de sobrevivência, mas a diminuir o risco de efeitos tardios potencialmente debilitantes (Marur *et al.* 2010).

É necessário investigar e entender porque razão a doença surge predominantemente em homens, o que se constata na nossa amostra, e se a história natural da infecção oral por HPV difere entre homens e mulheres. Melhores testes serão necessários para o diagnóstico do HPV e o uso do número de cópias de HPV DNA para o prognóstico e recidiva precoce precisa de ser analisado. Possibilidades para a prevenção primária e secundária devem ser avaliadas, incluindo o uso de vacinas de HPV contra a infecção e vacinas terapêuticas como tratamento adjuvante na recidiva loco-regional e metastática da doença. Por fim, enfrentamos o desafio de desenhar ensaios clínicos com estratificação de risco adequado, de forma a identificar o tratamento com menor morbidade. Um acompanhamento prolongado é essencial para entender melhor a sua história natural (Marur *et al.* 2010).

A selecção apertada da amostra, nomeadamente pela exclusão de doentes com hábitos tabágicos e etílicos, conferiu não significância estatística aos dados apurados.



REFERÊNCIAS / BIBLIOGRAFIA

- Al-Awadhi R, Chehadeh W, Kapila K (2011) Prevalence of human papillomavirus among women with normal cervical cytology in Kuwait. *J Med Virol*. 83(3): 453–460.
- Bristow RG, Benchimol S, Hill RP (1996) The p53 gene as a modifier of intrinsic radiosensitivity: implications for radiotherapy. *Radiother Oncol* 40: 197–223.
- Butz K, Geisen C, Ullmann A, Spitkovsky D, Hoppe-Sejler F (1996) Cellular responses of HPV-positive cancer cells to genotoxic anti-cancer agents: repression of E6/E7-oncogene expression and induction of apoptosis. *Int J Cancer* 68: 506–13.
- Capone RB, Pai SI, Koch WM, *et al.* (2000) Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 6: 4171–75.
- Chung CH, Ely K, McGavran L, *et al.* (2006) Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol* 24: 4170–76.
- D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, *et al.* (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356: 1944–56.
- Dahm-Daphi J (2000) p53: biology and role for cellular radiosensitivity. *Strahlenther Onkol* 176: 278–85.
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, *et al.* (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92: 709–20.
- Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, Steinsträsser L, Upile T, Jerjes W, Bernal-Sprekelsen M, *et al.* (2009). HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head neck oncology* 1(1): 36.
- Kumar B, Cordell KG, Lee JS, *et al.* (2008) EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 26: 3128–37.
- Liu Y, McKalip A, Herman B (2000) Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation. *J Cell Biochem* 78: 334–49.



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

- Liu Y, Xing H, Han X, *et al.* (2008) Apoptosis of HeLa cells induced by cisplatin and its mechanism. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* 28: 197–99.
- Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA (2010) HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 11: 781–89.
- Mendenhall WM, Werming JW, Pflister DG (2008) Cancer of Head and Neck: Treatment of Head and Neck Cancers. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 8th ed. (DeVita, VT, Lawrence, ST & Rosenberg, SA, eds.), pp809–77. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
- Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, *et al.* (2009) Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15: 1645–54.
- Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, *et al.* (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518–27.
- Park RB, Androphy EJ (2002) Genetic analysis of high-risk E6 in episomal maintenance of human papillomavirus genomes in primary human keratinocytes. *J Virol* 76: 11359–64.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74–108.
- Schilsky R (2009, May 15). In: Wart virus makes for less deadly cancer: study (Fox M, Health and Science ed). *Reuters*. Retrieved from <http://www.reuters.com/article/2009/05/15/us-cancer-head-virus-idUSTRE54D68B20090515>
- Silva ASB, Barroso S, Martins T (2007) Factores virais e dos hospedeiro envolvidos na infecção por HPV (Dissertação de Mestrado). Disponível em RCAAP (nº 2008001172).
- Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC (2005) Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20–44 years. *Cancer* 103: 1843–49.
- Smith EM, Rubenstein LM, Ritchie JM, *et al.* (2008) Does pretreatment seropositivity to human papillomavirus have prognostic significance for head and neck cancers? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17: 2087–96.



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

- Syrjänen S (2005) Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol* 32 Suppl 1: S59–66.
- Wagner EK, Hewlett MJ (2004). *Basic virology* (2nd ed). Maiden, MA: Blackwell Science.
- Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM (2008) Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 14: 366–69.
- World Health Organization (2007) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: volume 90 - Human Papillomaviruses. Lyon: International Agency for Research on Cancer.



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos os que tornaram, directa e indirectamente, possível a execução deste trabalho, que considero ser uma peça fundamental para a minha formação. Agradeço também, a todos os elementos do Instituto Português de Oncologia de Coimbra Francisco Gentil, a possibilidade que me deram de interligar a actividade clínica assistencial com a prática laboratorial o que, no meu entender, é premissa obrigatória para o bom exercício da Medicina.



TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE
MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

ANEXOS



INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DE COIMBRA
FRANCISCO GENTIL, E.P.E.

Exmo. Senhor
Dr. Nuno Bonito
(Serviço de Oncologia Médica)

ASSUNTO: Trabalho de Investigação "Qual a relação entre o papiloma vírus humano com os tumores da cabeça e pescoço?"

O trabalho acima mencionado foi analisado em reunião da Comissão de Ética, no dia 24/02/2010, não tendo sido tomada qualquer decisão por, na sua apreciação, terem surgido algumas questões relativamente à sua metodologia, para as quais solicitamos os seguintes esclarecimentos:

- . Nome do responsável pelo Projecto, atendendo a que não há coerência no nome indicado nos diversos documentos que fazem parte do pedido;
- . Indicação de como e por quem será feita a pré-selecção dos doentes;
- . Designação do profissional que vai elaborar a história clínica;
- . Indicação do momento de preenchimento do Consentimento Informado.

Solicita ainda o envio, a esta Comissão, do modelo de história clínica que pretende utilizar, bem como dos Currícula Vitae dos participantes no projecto.

Mais se informa que a próxima reunião será no dia 24/03/2010, pelo que se agradece o envio destas informações até à referida data.

Com os melhores cumprimentos.

Coimbra, 15 de Março de 2010

PEL'A COMISSÃO DE ÉTICA
O PRESIDENTE

(Dr. Jorge Martins)

Av. Bissaya Barreto, 95 - Apartado 2005 - 3001-651 COIMBRA
Telefone 239 400 200 - Fax 239 484 317
NIF 506 301 438



INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DE COIMBRA
FRANCISCO GENTIL, E.P.E.

Exmo. Senhor
Dr. Nuno Bonito
(Serviço de Oncologia Médica)

ASSUNTO: Projecto de Investigação "Qual a relação entre o Papiloma Vírus Humano com os tumores de cabeça e pescoço?".

Na sequência do V. pedido de autorização para a realização do projecto de investigação supracitado, informa-se V. Exa. que, com base nos pareceres favoráveis da Comissão de Ética, dos Directores dos Serviços de Oncologia Médica, Estomatologia e Cirurgia Maxilo-Facial, ORL, Anatomia Patologia e Patologia Molecular, do Gabinete Coordenador da Investigação e do Director Clínico, o Conselho de Administração autorizou a realização do mesmo.

Com os melhores cumprimentos.

Coimbra, 29 de Abril de 2010

PEL' O CONSELHO DE ADMINISTRAÇÃO
O PRESIDENTE

(Dr. Manuel António L. Silva)

CP

Consentimento Informado

Li e discuti com o investigador responsável pelo presente estudo os detalhes descritos neste documento. Entendo que sou livre para aceitar ou recusar, e que posso interromper a minha participação a qualquer momento sem dar uma razão. Concordo que os dados colectados para o estudo sejam usados para o propósito acima descrito.

Entendi a informação apresentada neste termo de consentimento. Tive a oportunidade para fazer perguntas e todas as minhas perguntas foram respondidas.

Receberei uma cópia assinada e datada deste Documento de Consentimento Informado.

_____	_____	_____
Nome do doente	Assinatura	Data

_____	_____	_____
Nome do Investigador	Assinatura	Data

ANEXO 4

Autorizações dos Serviços intervenientes no Estudo



INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DE COIMBRA
FRANCISCO GENTIL, E.P.E.

Coimbra, 09 de Setembro de 09

Exmos. Senhores

Para os devidos efeitos, declaro que autorizo a realização, no Serviço de Otorrinolaringologia do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil E.P.E., do estudo: "HPV em tumores da cabeça e pescoço" sob a responsabilidade do Dr. Nuno Alexandre Antunes Bonito.

Com os melhores cumprimentos

Dr. Arnaldo Guimarães
Director do Serviço de Otorrinolaringologia



INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DE COIMBRA
FRANCISCO GENTIL, E.P.E.

Coimbra, 09 de Setembro de 09

Exmos. Senhores

Para os devidos efeitos, declaro que autorizo a realização, no Serviço de Oncologia Médica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil E.P.E., do estudo: "HPV em tumores da cabeça e pescoço" sob a responsabilidade do Dr. Nuno Alexandre Antunes Bonito.

Com os melhores cumprimentos

Dra. Maria Helena Gervásio
Director do Serviço de Oncologia Médica

Av. Bissaya Barreto, 98 Apartado 2005 3001-651 COIMBRA
Telefone 239 400 200 - Fax 239 484 317
NIF 506 361 438



INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DE COIMBRA
FRANCISCO GENTIL, E.P.E.

Coimbra, 22 de Setembro de 2009

Para os devidos efeitos, declaro que disponibilizo os blocos de parafina das peças/biopsias anátomo-patológicas, ao Laboratório de Patologia Molecular do Instituto Português de Oncologia Coimbra Francisco Gentil, E.P.E., para a realização do estudo: "HPV nos tumores da cabeça e pescoço", sob a responsabilidade do Dr. Nuno Alexandre Antunes Bonito, desde que o mesmo não inviabilize as amostras.

Com os melhores cumprimentos

Doutora Maria Manuela Pinto Lacerda
Directora do Serviço de Anatomia Patológica



INSTITUTO PORTUGUÊS DE ONCOLOGIA DE COIMBRA
FRANCISCO GENTIL, E.P.E

Para os devidos efeitos, declaro que autorizo a realização, no Laboratório de Patologia Molecular do IPO de Coimbra de Francisco Gentil, EPE, do trabalho intitulado "HPV em tumores da Cabeça e Pescoço", da responsabilidade do Dr. Nuno Alexandre Antunes Bonito.

Doutora Teresa Martins
Directora do Laboratório de Patologia Molecular

Coimbra, 24 de Setembro de 2009.

ANEXO 5

Modelo de História Clínica

HISTÓRIA CLÍNICA

1. ANAMNESE

IDENTIFICAÇÃO DO DOENTE:

Nome, idade, sexo, raça, naturalidade, residência, estado civil, profissão (se reformado registar a profissão anterior), religião.

MOTIVO DO INTERNAMENTO ou CONSULTA (data):

Motivo principal que levou o doente a procurar auxílio médico – registo em poucas palavras da queixa (ou queixas) principal que levou o doente a procurar o médico, repetindo se possível as expressões utilizadas pelo doente.

2. HISTÓRIA DA DOENÇA ACTUAL:

Quando surgiu, como se manifestou (primeiros sintomas, ordem de aparecimento, causas aparentes), evolução cronológica dos sintomas, resultados dos exames, tratamentos instituídos e seus resultados – analisar o sintoma principal e todos os outros associados de acordo com o esquema abaixo:

1. início
2. duração
3. características do sinal/sintoma na altura em que teve início (localização, intensidade, relação com funções do organismo, factores desencadeantes, agravantes e atenuantes)
4. evolução (cronológica, modificações observadas, influência de tratamentos efectuados)
5. relação com outras queixas
6. situação do sintoma no momento actual

Características actuais da doença (evolução).

3. REVISÃO DE APARELHOS E SISTEMAS (aparentemente não directamente relacionados com a doença actual):

1. Sintomas gerais: febre, calafrios, sudorese, edemas, alterações do peso, astenia, anorexia,...
2. Pele e anexos:
Queixas cutâneas (prurido, erupções, pigmentação, cianose, lesões, palidez, sufusões hemorrágicas, ...), cabelos, pelos e unhas
3. Olhos:
Acuidade visual, visão nocturna, fotofobia, prurido, dor, secreção,....
4. Ouvidos:
Acuidade auditiva, dor, secreção, zumbidos, pavilhão auricular,....
5. Nariz e seios da face:
Acuidade olfativa, hemorragia, secreções,...
6. Orofaringe:
Dor, rouquidão,....
7. Cabeça e face:
Dor, tonturas, vertigens, amnésia,...
8. Aparelhos Cardiovascular e Respiratório:
Dor torácica, tosse, expectoração, dispneia, hemorragia, palpitação,....
9. Aparelho Digestivo:
Halitose, alterações da secreção salivar, alterações da gustação, alterações da deglutição (disfagia, odinofagia), náuseas, vômitos, hemorragia, pirose, enfartamento, dor, meteorismo, obstipação, diarreia, tenesmo, aumento do volume abdominal,...
10. Aparelho urinário:
Aspecto da urina, alterações no volume e frequência da micção, dor à micção, retenção urinária, incontinência urinária, dor lombar,...
11. Aparelho genital:
Dor, alterações no volume da bolsa escrotal, impotência, sangramentos, menarca, menstruação, alterações do fluxo menstrual, prurido,...
12. Sistema Linfático:
Tumorações, edema,...
13. Membros e aparelho locomotor:
Dor, edema, alterações da temperatura,...
14. Sistema Nervoso:
Distúrbios do sono, déficite motor, déficite de sensibilidade,...

4. HISTÓRIA PREGRESSA

5. ANTECEDENTES PESSOAIS:

NÃO PATOLÓGICOS:

Gestação, nascimento e desenvolvimento.

Menarca, menopausa, características do ciclo menstrual, actividade sexual, gestações e filhos.

Hábitos alimentares, consumo de álcool, tabaco, drogas ilícitas, medicamentos habituais (e doses), exercício físico.

Vacinações.

PATOLÓGICOS:

Doenças anteriores/ actuais, cirurgias, traumatismos, alergias, transfusões,...

HISTÓRIA SÓCIO-ECONÓMICA: condições socio-económicas e culturais, perfil psico-social, meio ambiente (habitação, contacto com animais e outros na medida em que possam ter tido influência no estado de saúde); ambiente profissional actual e passado, estadias em outros países.

ANTECEDENTES FAMILIARES:

Doenças dos pais, irmãos, filhos, cônjuge, avós, tios,...

Falecidos: indicar causa do óbito e idade.

6. EXAME OBJECTIVO

OBSERVAÇÃO GERAL

Estado de consciência, orientação no espaço e no tempo, colaboração no interrogatório.

Idade real e aparente, biótipo morfológico e fâcies.

Estado nutricional, peso, altura, IMC.

Pressão arterial e pulsos.

Temperatura corporal.

Distribuição pilosa, coloração da pele e mucosas.

Hidratação.

Adenomegalias e edemas.

EXAME OBJECTIVO

· Cabeça

o Olhos

o Ouvidos

o Nariz

o Boca

· Pescoço (exame da tiróide)

· Tórax

o Área pulmonar (Inspeção, Palpação, Percussão, Auscultação)

o Área cardíaca (Inspeção, Palpação, Percussão, Auscultação)

o Mamas

· Abdómen (Inspeção, Palpação, Percussão, Auscultação)

· Coluna vertebral

· Membros

o Superiores

o Inferiores

· Órgãos genitais

· Ânus (toque rectal) e região perineal

· Exame neurológico

7. RESUMO DA HISTÓRIA CLÍNICA

