

Detecção e genotipagem do HPV em esfregaços e biópsias buco-faríngeas

HPV detection and genotyping in oral-pharyngeal biopsies and swabs

Daniela Cochicho • Ana Hebe • Hugo Estibeiro • Lígia Ferreira • Luís Martins • Luís Oliveira • Pedro Montalvão • Ricardo Pacheco
Rui Fino • Mário Cunha • Miguel Magalhães

RESUMO

Âmbito: Cerca de 90% dos carcinomas da região cabeça-pescoço são de células escamosas (HNSCC), e incluem a cavidade oral, nasofaringe, laringe, hipofaringe e orofaringe. É uma doença com uma etiologia complexa em que o consumo de álcool e tabaco são os principais factores de risco. Na última década, observou-se um aumento na incidência no carcinoma da orofaringe (OPSCC), que inclui os tumores da amígdala e

base da língua, os quais estão maioritariamente associados à presença do vírus do Papiloma Humano (HPV). De acordo com alguns estudos preliminares, a população com OPSCC e presença de HPV é tipicamente mais nova e apresenta um prognóstico mais favorável, colocando-se a hipótese de desintensificação terapêutica a aplicar neste *cohort*.

Objectivo: Determinar a prevalência, identificar os genótipos do HPV e correlacionar os diferentes factores de risco na população do IPOLFG com diagnóstico de OPSCC.

Desenho do estudo: É um estudo prospectivo, longitudinal e observacional, realizado no Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil, centro de prestação de cuidados de saúde diferenciados na área da oncologia.

Material e Métodos: População recrutada do Serviço de Otorrinolaringologia do IPOLFG com lesões na orofaringe, entre o período de 2009 a 2014. No total, 78 pacientes foram incluídos para análise (idade média 58 anos), 60 homens (idade média 57 anos) e 18 mulheres (idade média 62 anos). A detecção e genotipagem do HPV foram elaboradas por meio de técnicas de biologia molecular; nomeadamente tecnologia PCR em Tempo Real por tecnologia in house, com utilização da fluorescência SYBR Green e com primers SPF10 que detecta cerca de 40 genótipos do HPV diferentes. A genotipagem foi efectuada por tecnologia MicroArray (Papillocheck™) e Lira (INNO-LiPA™) que identificam cerca de 27 genótipos de HPV diferentes.

Resultados: A população avaliada maioritariamente masculina (3:1) com idade média de 58A, 74% com diagnóstico de OPSCC e 80% apresenta de hábitos de consumo. Nos 58 pacientes com OPSCC estimou-se uma prevalência a HPV de 59%, em que o HPV16 é o genótipo maioritário (62%) dos casos positivos. **Conclusões:** Os dados obtidos, prevalência do HPV e genótipo mais frequente são semelhantes aos obtidos noutros estudos e vêm confirmar a existência de duas entidades distintas (carcinoma HPV positivo e carcinoma HPV Negativo) na população avaliada.

Palavras-chave: detecção HPV, HPV16, carcinoma da orofaringe, factores de risco

ABSTRACT

Scope: Approximately 90% of head-neck carcinomas are squamous cell carcinomas (HNSCC), that includes the oral cavity, nasopharynx, larynx, hypopharynx and oropharynx. It is a disease with a complex etiology with the alcohol and tobacco consumption being the main risk factors. In last decade, there has been an increase in incidence of oropharyngeal carcinoma

Daniela Cochicho

Virologista, Laboratório de Virologia – Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Ana Hebe

Assistente Hospitalar, Serviço de Otorrinolaringologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Hugo Estibeiro

Assistente Hospitalar Graduado, Serviço de Otorrinolaringologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Lígia Ferreira

Assistente Hospitalar Graduado, Serviço de Otorrinolaringologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Luís Martins

Virologista, Laboratório de Virologia – Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Luís Oliveira

Assistente Hospitalar Graduado, Serviço de Otorrinolaringologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Pedro Montalvão

Assistente Hospitalar Graduado, Serviço de Otorrinolaringologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Ricardo Pacheco

Assistente Hospitalar, Serviço de Otorrinolaringologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Rui Fino

Assistente Hospitalar Graduado, Serviço de Otorrinolaringologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Mário Cunha

Virologista, Responsável do Laboratório de Virologia – Serviço de Patologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Miguel Magalhães

Director de Serviço de Otorrinolaringologia do Instituto Português de Oncologia de Lisboa

Correspondência:

Daniela Cochicho
Rua Prof. Lima Basto, 1900-023 Lisboa
Telefone: 21 722 98 66
Fax: 21 720 04 95
Email: dcochicho@ipolisboa.min-saude.pt

Artigo recebido a 21 de Junho de 2016. Aceite para publicação a 13 de Novembro de 2017.

(OPSCC), that includes tumors of the amygdala and the base of the tongue, mostly associated with the presence of Human Papilloma Virus (HPV). According to some preliminary studies, the population with OPSCC and presence of HPV is typically younger and presents favorable prognosis, posing the hypothesis of therapeutic de-intensification to be applied in this cohort.

Objective: Estimate prevalence and identify the HPV genotypes. Correlation of the different risk factors in OPSCC diagnosis in a population from a tertiary center in Lisbon.

Study Design: It is a prospective, longitudinal and observational study in tertiary cancer centre in Lisbon, Portugal.

Material and methods: Population from the Otorhinolaryngology department from a tertiary center in Lisbon, with lesions in the oropharynx, selected between 2009 and 2014. In total, 78 patients were included for analysis (mean age 58 years), 60 men (mean age 57 years) and 18 women (mean age 62 years). HPV detection was performed using molecular biology techniques briefly, an In-house real-time PCR, with fluorescence dye SYBR Green and SPF10 primers, was optimized to detect 40 different HPV genotypes; The genotyping was performed with array or/and Lira technology that identify about 27 different HPV genotypes.

Results: The majority of the population evaluated is male (3: 1) with a mean age of 58A, 74% with a diagnosis of OPSCC and 80% had habits of consumption. In the 58 patients with OPSCC, the estimated HPV prevalence was 59%, where HPV16 is the most present genotype (62%) in the positive cases

Conclusions: The data obtained is consistent with other publications regarding prevalence of HPV and most frequent genotype. In this cohort was possible to confirm the existence of two distinct entities in OPSCC (HPV positive and HPV Negative).

Keywords: HPV detection, HPV16, oropharyngeal carcinoma, risk factors

INTRODUÇÃO

Segundo os dados do IARC (International Agency for Research on Cancer), anualmente são diagnosticados cerca de 456,000 (3,2% de todos os cancros) de novos casos de cancros da região da cabeça e pescoço com uma mortalidade de aproximadamente 400,000 casos (4,9% por todas as mortes por cancro)^[1].

Cerca de 90% destes carcinomas são de células escamosas (HNSCC)^[2], e incluem a cavidade oral, nasofaringe, laringe, hipofaringe e orofaringe. É uma doença com uma etiologia complexa, em que o consumo de álcool e tabaco são os principais factores de risco, com ampla descrição e fundamentação na literatura^[3].

Nas últimas décadas, e em algumas zonas geográficas, houve um aumento na incidência no carcinoma de células escamosas da orofaringe (OPSCC), que inclui os tumores da amígdala e base da língua, os quais estão, maioritariamente, associados à presença do vírus do Papiloma Humano (HPV) e desenvolvem-se em indivíduos mais novos e sem histórico de hábitos de consumo^[5, 6, 7]. Foi, aliás, por esta razão que o IARC reconheceu em 2007 que o HPV é um factor de risco no OPSCC, especialmente o HPV 16^[7].

Cerca 35% dos OPSCC estão relacionados com a

presença do HPV, com 80% associados ao HPV 16, definindo assim uma nova entidade em termos de epidemiologia e sobrevida dos carcinomas da região de cabeça e pescoço^[7].

Actualmente, as intervenções terapêuticas em pacientes com HNSCC incluem a cirurgia, a quimioterapia e radioterapia, não existindo quaisquer diferenças na abordagem terapêutica entre paciente com HNSCC associado ao HPV e/ou hábitos de consumo.^[8] De acordo com alguns estudos preliminares, a população com OPSCC e presença de HPV é tipicamente mais nova e apresenta um prognóstico mais favorável, colocando-se a questão sobre a diminuição dos níveis de intensificação terapêutica aplicados a um cohort que manifesta uma melhor sobrevida.^[9, 10, 11]

Dada a necessidade de novas ferramentas de diagnóstico que contribuam para a identificação precoce desta patologia e considerando os diferentes factores a ela associados, a presença do HPV revela ser um bom indicador de prognóstico.

Este estudo tem como objectivo avaliar a prevalência do HPV na população do IPOLFG com OPSCC e identificar os genótipos mais frequentes por meio de técnicas de Biologia Molecular.

MATERIAL E MÉTODOS

1. População de estudo

Foram seleccionados todos os pacientes referenciados à consulta do Serviço de Otorrinolaringologia do IPOLFG entre 2009 a 2014, de acordo com os seguintes critérios de selecção:

- Diagnóstico de lesão na região da orofaringe que inclui base da língua, palato mole, amígdala, orofaringe.
- Avaliação Anátomo-patológica com confirmação citológica ou histológica
- Avaliação Laboratorial para a detecção do HPV
- Avaliação dos Hábitos de consumo

Foram excluídos todos os pacientes com outro diagnóstico de neoplasia maligna que não das vias aéreas digestivas superiores.

2. Recolha da amostra biológica

A cada paciente com lesão na orofaringe foi recolhida uma amostra por meio de esfregaço e/ou biópsia, na consulta ou no bloco operatório, e são conservadas em meio ThinPrep conservado a 4°C até processamento. As amostras são avaliadas em termos de histologia e presença de DNA do HPV.

3. Extracção DNA

Após recolha e lavagem das células por centrifugação (esfregaço) ou corte (biópsia), procedeu-se à lise celular através da adição de 250µL de tampão de lise e 25 µL de proteínase K, com uma incubação de 12-16 horas a 56°C. Após esta lise celular, procedeu-se ao isolamento do DNA utilizando o Qiam MiniElute Virus Kit

(Qiagen, Valencia, CA), segundo o protocolo descrito. A quantidade e qualidade do DNA obtido é avaliado por espectrofotometria (Nanodrop, Thermo Scientific, Waltham, MA).

4. Detecção e genotipagem HPV

A detecção do DNA do HPV é realizado através do ensaio PCR em Tempo Real In House, com corante SYBR GREEN, o qual permite a detecção de 40 genótipos de HPV de alto e baixo risco^[12]. Este ensaio de PCR utiliza os primers específicos SF10, os quais amplificam um fragmento de 75 pares de bases na região L1, de acordo com o seguinte programa de amplificação: 1 ciclo 50°C (2 minutos) e 95°C (10 minutos); 50 ciclos 95°C (30 segundos) e 60°C (60 segundos). Após a amplificação, realiza-se o passo de dissociação: 95° (15 segundos), 60°C (30 segundos) e 95°C (15 segundos). Na identificação dos genótipos do HPV são utilizadas duas tecnologias diferentes; Microarrays (Papillocheck, Greiner Bio-One, GmbH) que detecta 24 genótipos; e INNO-LIPA (Fujirebio Europe, N.V.) que detecta 27 genótipos, segundo os protocolos

de instrução estabelecidos nas respectivas bulas.

RESULTADOS

A população estudada é predominante masculina (proporção de 1 mulher para 3 homens), com uma idade média de 58 anos. Do ponto de vista de hábitos de consumo, a grande maioria (80%) indicam que são consumidores de tabaco e/ou álcool.

Em termos de histologia, 74% (58/78) apresentam um diagnóstico de carcinoma (3 pacientes em recidiva) e 26% (20/78) são negativos para neoplasia. Do ponto de vista histológico, a grande maioria 93% (54/58) é do tipo pavimento-celular. Em termos de gênero, 78% (44/58) dos casos de carcinoma são em homens, com uma idade média de 60A, com 95% da população masculina a apresentar hábitos de consumo (42/44).

No universo das 78 amostras 50% (39/78) são positivas para HPV. Avaliando a prevalência do HPV nas várias variáveis clínicas e demográficas (tabela 1), verifica-se uma maior percentagem de HPV positivos nos Homens (52% vs 44%). Em termos de idade, tantos os Homens

TABELA 1
Prevalência HPV por variáveis demográficas e clínica

Gênero	Total	HPV (+)	HPV (-)
Homens	77% (60/78)	52% (31/60)	48% (29/60)
Mulheres	23% (18/78)	44% (8/18)	56% (10/18)
Idade			
Média	58.4A	60.4A	56.4A
Homens	57.3A	58.6A	56A
Mulheres	61.9A	67.3A	57.7A
≥60 A	49% (38/78)	53% (20/38)	47% (18/38)
< 60 A	51% (40/78)	48% (19/40)	53% (21/40)
Hábitos de Consumo			
Com Hábitos de Consumo	80% (62/78)	48% (30/62)	52% (32/62)
Sem Hábitos de consumo	15% (12/78)	58% (7/12)	42% (5/12)
Sem Informação	5% (4/78)	50% (2/4)	50% (2/4)
Patologia			
Carcinoma	74% (58/78)	59% (34/58)	41% (24/58)
Homens	78% (44/58)	64% (28/44)	36% (16/44)
Mulheres	22% (14/58)	43% (6/14)	57% (8/14)
Com Hábitos de Consumo	86% (50/58)	58% (29/50)	42% (21/50)
Sem Hábitos de Consumo	12% (7/58)	71% (5/7)	29% (2/7)
Sem informação	2% (1/78)	0%	100% (1/1)
Outras lesões	26% (20/78)	25% (5/20)	75% (15/20)
Homens	80% (16/20)	19% (3/16)	81% (13/16)
Mulheres	20% (4/20)	50% (2/4)	50% (2/4)
Com Hábitos de Consumo	60% (12/20)	8% (1/12)	92% (11/12)
Sem Hábitos de Consumo	25% (5/20)	40% (2/5)	60% (3/5)
Sem informação	15% (3/20)	67% (2/3)	33% (1/3)

TABELA 2

Distribuição dos factores de risco por diagnóstico

Factores de Risco (n=74)*		Diagnóstico Histológico	
Hábitos de Consumo Álcool/tabaco	HPV status	Carcinoma	Negativo para neoplasia
Presente	Negativo	21 (36.8%)	11 (64.7%)
Ausente	Negativo	2 (3.5%)	3 (17.6%)
Presente	Positivo	29 (50.9%)	1 (5.9%)
Ausente	Positivo	5 (8.8%)	2 (11.8%)

*4 sem informação disponível para hábitos de consumo

como as Mulheres com HPV (+) apresentam uma idade média superior relativamente aos Homens e Mulheres HPV (-).

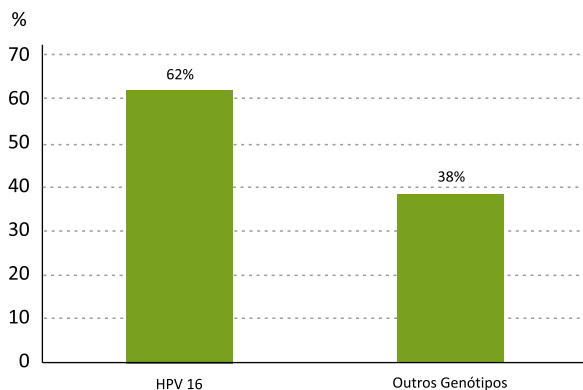
A percentagem de carcinomas em que o HPV é detectado é de 64% (28/44) nos homens e 36% nas mulheres (16/44). As amostras com resultado negativo para neoplasia têm uma baixa prevalência de HPV (25%), valor este que sobe para os 59% no caso das amostras com resultado confirmado de neoplasia (Tabela 1).

Avaliando os factores de risco, nos casos de carcinoma 50.9% dos casos apresentam hábitos de consumo e presença de HPV, 36.8% apenas com hábitos de consumo e 8.8% apenas com presença de HPV (Tabela 2).

A caracterização dos genótipos de HPV na amostra revela que o HPV16 é o genótipo mais prevalente nos carcinomas da orofaringe (Gráfico 1).

GRÁFICO 1

Distribuição dos genótipos nos carcinomas da orofaringe



DISCUSSÃO

Os dados confirmam a epidemiologia e prevalência do HPV nas lesões da região da orofaringe: são lesões predominantes em homens (proporção de 1 mulher para 3 homens), em que a prevalência do HPV é de 59% nos OPSCC e o HPV 16 é o genótipo mais frequente (62%).

Da análise dos factores de risco observa-se que nos casos com OPSCC em 50.9% com ambos os factores de risco, 36.8% aparecem apenas com Hábitos de consumo e em 8.8% apenas com HPV.

CONCLUSÕES

Os dados epidemiológicos deste cohort confirmam os valores de prevalência do HPV em OPSCC. No entanto, a população avaliada apresenta elevados hábitos de consumo e maioritariamente estão presentes os dois factores de risco. Nos vários estudos publicados é evidenciado que os pacientes com melhor prognóstico são os que não têm hábitos de consumo e que apresentam carcinomas HPV positivos, o que não foi observado na nossa população. Futuramente, e de forma a garantir uma melhor compreensão clínica desta patologia, seria importante mais estudos da prevalência do HPV na população OPSCC quanto à sua implicação no prognóstico e abordagem terapêutica.

Protecção de pessoas e animais

Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos responsáveis da Comissão de Investigação Clínica e Ética e de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial.

Confidencialidade dos dados

Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de doentes.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

Referências bibliográficas:

- [1]Globocan:<http://gco.iarc.fr/today/fact-sheetscancers?cancer=4&type=0&sex=0>; 28-11-2016
- [2]National Cancer Institute: Oropharyngeal Cancer Treatment (PDQ); Health Professional Version; last modified 02/17/2016
- [3]Oncologia Oral. Lucio Lara Santos; Luis Medeiros Teixeira. Bial. Lidel, Junho 2011. ISBN978-972-757-782-8
- [4]Sturgis EM; Cinciripini PM. Trends in Head and Neck Cancer Incidence in relation to smoking prevalence. An emerging Epidemic of Human Papillomavirus-Associated Cancers? Cancer vol.110 (7) [1429-1435]. Outubro 2007
- [5]Syrjanen S. Human Papillomaviruses in Head and Neck Carcinomas. N Engl J Med 356;19 [1993-1996]. Maio 2007

- [6]Dalianis T; Nasman A; et al. Incidence of Human Papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: An epidemic of viral-induced carcinoma? *Int. J. Cancer*: 125, 362-366. 2009
- [7]World Health Organization - International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 90, Human Papillomaviruses. WHO Press. Lyon, France 2007. ISBN 978-92-832-1290-4
- [8]Evans M; Powell NG. The changing Aetiology of Head and Neck Cancer: the role of Human Papillomavirus. *Clinical Oncology* 22 (7) [538-46]. Settembre 2010
- [9]Denaro N; Russi E; et al. State of the Art and Emerging Treatment Options in the Management of Head and Neck Cancer: News from 2013. *Oncology* 86 [212-229]. Maio 2014
- [10]Whang SN, Filippova, M, et al. Recent Progress in Therapeutic Treatments and Screening Strategies for the Prevention and Treatment of HPV-Associated Head and Neck Cancer. *Viruses* 7 [5040-5065] 2015
- [11]Huang, SH, Xu W, et al. Refining American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control TNM Stage and Prognostic Groups for Human Papillomavirus-Related Oropharyngeal Carcinomas. *Journal of Clinical Oncology* 33 (8) [836-847] 2015
- [12] Payan C.; Human Papillomavirus Quantification in Urine and Cervical samples by using the MX4000 and lightcycler general real-time PCR systems. *Journal of Clinical Microbiology*, vol 45 (3) [897-901], mar. 2007