



Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Imunologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA
CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES COM INFECÇÃO POR
ESTE VÍRUS NA MUCOSA CÉRVICO-VAGINAL**

Andréa Padre Peixoto

Salvador-Bahia-Brasil
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade Federal da Bahia
Instituto de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Imunologia

**DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA
CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES COM INFECÇÃO POR
ESTE VÍRUS NA MUCOSA CÉRVICO-VAGINAL**

Andréa Padre Peixoto

Orientadora: Dra. Silvia Inês Sardi
Co-Orientador: Dr. Gúbio Soares Campos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Imunologia.

Salvador-Bahia-Brasil
2006

Ficha catalográfica elaborada pela biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia.

P 397 Peixoto, Andréa Padre,

Detecção do Papilomavírus humano na cavidade bucal de pacientes com infecção por este vírus na mucosa cérvico-vaginal/ Andréa Padre Peixoto. Salvador, 2006

88f. : il.

Orientadora: Prof. Dra. Sílvia Inês Sardi.

Co-orientador: Prof. Dr. Gúbio Soares Campos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Imunologia – PPGIm, 2006.

1. Papilomavírus humano. 2. IgA. 3. Cavidade bucal. I. Sardi, Sílvia Inês. II. Campos, Gúbio Soares. III. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 578

“A beleza está nas pessoas, nas plantas, nos bichos, em todas as coisas de Deus. É mais intensa ainda nos olhos de quem consegue ver, acima da simplicidade, a beleza com que Ele criou cada pequeno detalhe da vida”.

Irmã Dulce

Dedico este estudo à vida que me é concedida a oportunidade de amadurecer e evoluir de mãos dadas com o conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, meu pai, por me dar à vida plena;

A minha mãe que bravamente me ensinou o caminho do idealismo e propósito de vida;

A meu pai que com o seu caráter me fez uma pessoa ética e digna com as minhas atitudes;

A Léo por todo o seu amor, renúncia, compreensão e força nos momentos de angústia;

A toda a minha família, avós, tios, primos e verdadeiros amigos por serem a minha motivação;

A tia Vera pelo seu amor e carinho de mãe, me ajudando e motivando nos momentos difíceis;

A Dra. Silvia Sardi pelos ensinamentos da ciência e da vida;

Ao Dr. Gúbio Soares Campos por acreditar e me oferecer esta oportunidade;

Aos meus verdadeiros mestres que são muitos e representam sempre exemplos a serem seguidos: Antônio Fernando Falcão, Isabel Vianna, Silvio Albergaria, Lauro Araripe, Claudemiro do Espírito Santo, Marcondes Queiroz Oliveira, Maria Amélia Soares da Cunha, Lúcia Neves, Joanita, Dina Marchesine, Maria Conceição de Abreu;

Ao PPGIm e ao CNPq por essa oportunidade de aprendizado, bem como aos meus queridos professores do mestrado por iluminarem as trilhas do conhecimento imunológico;

A Irmã Dulce pela sua sapiência e dedicação à caridade e como resultado disso fundou as Obras Sociais Irmã Dulce;

As Obras Sociais Irmã Dulce e todos os seus integrantes pelo carinho e respeito comigo e com o meu estudo;

A Henrietta Lacks pela sua enorme contribuição com as linhagens celulares HeLa para o desenvolvimento da ciência;

Aos pacientes pela confiança e credibilidade manifestadas;

A Silvia Pimentel pela mão estendida através dos seus conhecimentos, mas em especial por se mostrar uma grande amiga;

A Dr. Moisés Sadigursky por todos os ensinamentos, em especial, da Imunologia;

Aos colegas de profissão, do mestrado, do Laboratório de Virologia, Imunologia e Neurociência do Instituto de Ciências da saúde da UFBA pelo apoio e ajuda desprendida;

A Dilcéia pela disponibilidade de sempre;

A Eli pela grande dica;

A Antônio Porto por me auxiliar com os seus conhecimentos das ciências exatas;

A Adriano Alcântara por longas horas de discussões sobre a Imunologia;

A Eliana Galvão pela amizade, carinho e disponibilidade para comigo;

A Ana Cristina Nascimento pela sua motivação para com o meu estudo;

A Carla Hilário pela mão estendida;

A Soraya por sempre está disponível a ajudar;

Aos meus alunos em especial à Sabrina que me motivam a dedicar-me aos estudos;

A TODOS do céu e da terra, que vibram e acreditam em minha escolha de vida, e que de alguma forma me ajudaram e não foram citados, o meu muito obrigada, a minha vida não teria tanto significado se não fossem vocês!

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1 Papilomavírus humano na Cavidade Bucal.....	16
2.1.1 Classificação.....	17
2.1.2 Morfologia Viral.....	18
2.1.3 Biossíntese Viral.....	19
2.1.4 Vias de Transmissão.....	21
2.1.5 Patogenesia e Fatores de Risco para a infecção pelo HPV.....	23
2.1.6 Manifestações Clínicas.....	25
2.1.7 Histopatologia.....	26
2.1.8 Resposta Imune.....	26
2.1.9 Diagnóstico e Tratamento.....	33
2.2 Mucosa Bucal e Resposta Imune.....	34
2.2.1 Secreção Salivar.....	34
2.2.1.1 Considerações Gerais.....	34
2.2.1.2 Saliva como Ferramenta de Diagnóstico.....	36
2.2.1.3 Imunoglobulina A e seu mecanismo de ação.....	38
3 JUSTIFICATIVAS.....	42
4 OBJETIVOS.....	43
4.1 Geral.....	43
4.2 Específicos.....	43
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
5.1 Amostragem.....	44
5.1.1 Critérios de Inclusão.....	44
5.1.2 Critérios de Exclusão.....	44
5.2 Coleta de Dados e Amostras.....	45
5.2.1 Exame Físico Intrabucal de Partes Moles.....	45
5.2.2 Saliva.....	45
5.2.3 Mucosa Bucal.....	45

5.2.4 Biópsia.....	46
5.3 Detecção de IgA.....	46
5.3.1 Imunofluorescência Indireta.....	46
5.3.1.1 Cultivo de Células.....	46
5.3.1.2 Preparação das Lâminas.....	47
5.3.1.3 Detecção de Anticorpos.....	47
5.4 Detecção do DNA viral (PCR).....	48
5.4.1 Tratamento das Amostras e Extração do DNA Viral.....	48
5.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	48
5.4.3 Análise dos Produtos do PCR por Eletroforese em Gel de Agarose.....	49
5.5 Análises Estatísticas.....	50
5.6 COMITÊ DE ÉTICA.....	50
6 RESULTADOS.....	51
6.1 Detecção da Imunoglobulina A anti-HPV pelo método da Imunofluorescência indireta (IFI).....	51
6.2 Detecção do DNA-HPV pela Reação em cadeia da polimerase	53
6.3 Resultados comparativos da detecção do HPV nas células da mucosa bucal (PCR) e IgA específica na saliva (IFI).....	54
6.4 Caracterização da população quanto aos fatores sócio-demográficos, comportamentais e de saúde.....	55
6.5 Caracterização da população quanto a saúde bucal.....	58
6.6 Associação dos fatores de risco para infecção por HPV e presença de DNA viral nas células da mucosa bucal.....	60
6.7 Associação dos fatores de risco para infecção por HPV e presença da imunoglobulina A específica na saliva.....	64
7 DISCUSSÃO.....	67
8 CONCLUSÕES.....	74
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	75
10 ANEXOS.....	82

LISTA DE FIGURAS

Figura I. HPV-16. Mapa genômico (SHAH & HOWLEY, 1900).....	18
Figura II. Estrutura IgA dimérica (JANEWAY <i>et al.</i> , 2002b).....	38
Figura 1.A. Imunofluorescência indireta em células HeLa infectadas pelo HPV 18. Amostra de saliva diluída em 1:2.....	52
Figura 1.B. Imunofluorescência indireta em células HeLa infectadas pelo HPV 18. Amostra de saliva diluída em 1:4.....	52
Figura 1.C. Imunofluorescência indireta em células HeLa infectadas pelo HPV 18. Amostra de soro bovino diluído em 1:10.....	52
Figura 1.D. Controle negativo com amostra de saliva paciente saudável diluída em 1:2. Indica ausência de fluorescência citoplasmática.....	52
Figura 2. Detecção do DNA viral em amostras de esfregaço da mucosa bucal.	54
Figura 3. Fotomicrografia de papiloma de orofaringe.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Seqüência de nucleotídeos e <i>primers</i>	49
Tabela 1. Imunofluorescência indireta em células HeLa - Detecção de IgA anti-HPV na saliva	51
Tabela 2. PCR - Detecção do DNA-HPV em esfregaço da mucosa bucal	53
Tabela 3. Comparação dos resultados dos métodos de diagnóstico PCR e IFI ...	55
Tabela 4. Características sócio-demográficas da população do estudo	56
Tabela 5. Características comportamentais da população do estudo	57
Tabela 6. Características de saúde da população do estudo	58
Tabela 7. Características de saúde bucal da população quanto à distribuição das lesões orais em tecido mole manifestadas previamente ao estudo.....	59
Tabela 8. Características de saúde bucal da população quanto à distribuição das lesões orais em tecido mole manifestadas ao exame físico intrabucal.....	60
Tabela 9. Razões de prevalência bruta e os respectivos intervalos de confiança a 95% para associações entre fatores de risco sócio-demográficos e de saúde em relação à infecção pelo HPV oral.....	61
Tabela 10. Razões de prevalência bruta e os respectivos intervalos de confiança a 95% para associações entre fatores de risco comportamentais em relação à infecção pelo HPV oral.....	63
Tabela 11. Razões de prevalência bruta e os respectivos intervalos de confiança a 95% para associações entre fatores de risco de saúde em relação à presença de IgA anti-HPV.....	64
Tabela 12. Razões de prevalência bruta e os respectivos intervalos de confiança a 95% para associações entre fatores de risco comportamentais em relação à presença de IgA anti-HPV	65

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs: Células apresentadoras de antígenos

DNA: Ácido desoxirribonucléico

dNTP: Desoxinucleotídeos

FITC: Isotiocianato de fluoresceína

GALT: Tecidos linfóides associados ao intestino

HE: Hematoxilina-eosina

HPV: Papilomavírus humano

I.C.: Intervalo de confiança

IFI: Imunofluorescência Indireta

IFI-: Imunofluorescência negativo

IFI+: Imunofluorescência positivo

IFN- α : Interferon α

IFN- β : Interferon β

IFN- γ : Interferon γ

IgA: Imunoglobulina A

IgE: Imunoglobulina E

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

***kappa* :** κ

LCR: Região longa de controle

MALT: Tecidos linfóides associados à mucosa

MHC: Complexo Principal de Histocompatibilidade

NK: Células *natural killers*

ORFs: *Open read frames*

pb: Pares de base

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PCR-: Reação em cadeia da polimerase negativa

PCR+: Reação em cadeia da polimerase positiva

pH: potencial hidrogeniônico

PM: Marcador de peso molecular

pRb: Proteína retinoblastoma

RNA: ácido ribonucléico

RNA_m: RNA mensageiro

RP: Razão de prevalência

rpm: Rotações por minuto

SC: Componente secretor

SIgA: Imunoglobulina A secretora

SNR: Região curta não codificadora

Taq DNA: DNA polimerase do organismo *Thermus aquaticus*

TGF- β : Fator de crescimento tumoral

TNF- α : Fator de necrose tumoral

VLPs: Partículas semelhantes a vírus

RESUMO

DETECÇÃO DO PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA CAVIDADE BUCAL DE PACIENTES COM INFECÇÃO POR ESTE VÍRUS NA MUCOSA CÉRVICO-VAGINAL

ANDRÉA PADRE PEIXOTO

O Papilomavírus humano (HPV) é o agente etiológico da doença sexualmente transmissível mais prevalente em todo o mundo. São conhecidos mais de 100 tipos diferentes deste vírus e aproximadamente 24 estão relacionados à infecção oral por HPV. Ainda não está bem definida a via de transmissão para a cavidade bucal, no entanto, a autotransmissão e o contato direto são considerados como os modos de transmissão mais prováveis. O presente estudo teve como objetivo pesquisar a prevalência do HPV oral em mulheres portadoras deste vírus na mucosa cérvico-vaginal, investigar a presença da imunoglobulina A anti-HPV na saliva, e avaliar os possíveis fatores de risco para a infecção por este vírus. Amostras de células esfoliadas da mucosa bucal e saliva de 100 pacientes foram coletadas. A presença do DNA viral nas células da mucosa bucal foi determinada através da reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando os *primers* MY09-MY11. A detecção de IgA anti-HPV na saliva foi realizada pelo método de imunofluorescência indireta (IFI). Foi observada positividade para o DNA-HPV em 81% dos esfregaços da mucosa bucal e para IgA específica em 44% das amostras de saliva. Este achado de um menor percentual da presença de IgA anti-HPV em relação a positividade para infecção por HPV na cavidade bucal, poderia estar relacionado a oroinfecção recente em alguns casos. Observou-se também que a ocorrência de lesões recidivantes cervicais determinou prevalência mais elevada de IgA na saliva.. Estudos futuros são necessários para melhor avaliar a resposta imune do hospedeiro frente a uma infecção por este vírus nos tecidos bucais.

Palavras Chaves: Papilomavírus Humano, IgA, cavidade bucal.

SUMMARY

HUMAN PAPILLOMAVIRUS DETECTION ON ORAL CAVITY OF PATIENTS WITH CERVICAL MUCOSA HPV INFECTION

ANDRÉA PADRE PEIXOTO

Human Papillomavirus (HPV) is the most frequent cause of sexual diseases. There are more than 100 different kinds of HPV and 24 have a close relationship to HPV oral infection. As yet, the route of infection to the oral cavity has not been established, nevertheless, selftransmission and close contact with infected individuals are considered the most probable ways of infection. The main aspects of this study were: 1) to determine the prevalence of oral HPV infection in women who have HPV infection in the cervical mucosa; 2) to detect anti-HPV immunoglobulin A in oral fluid and 3) to evaluate the risk factors for this virus infection. Samples of saliva and a mouth swab were collected in 100 patients and the presence of viral DNA in the oral epithelial cells was determined by polymerase chain reaction (PCR), using the primers (MY09-MY11). Indirect immunofluorescence was employed in the detection of IgA in saliva. Results show that 81% of oral epithelial cells samples were positive for DNA- HPV and 44% of oral fluid samples for IgA anti-HPV. This results of low specific IgA prevalence and high percentage of oral epithelial cells infected would be related with early oral HPV infection in some cases. It was also observed that the occurrence of cervical relapse injuries determined higher prevalence of IgA in the saliva. However, future studies will be necessary to better evaluate the immune response in HPV oral infection.

Key words: Human Papillomavirus, IgA, oral cavity.

1 INTRODUÇÃO

O Papilomavírus humano (HPV) é o agente etiológico da doença sexualmente transmissível mais prevalente em todo o mundo nos dias atuais. Durante muitos anos a infecção por HPV foi considerada uma patologia benigna, entretanto estudos demonstram seu papel na gênese do carcinoma do trato genital inferior feminino, e inúmeras pesquisas passaram a ser desenvolvidas sobre esse tema. A associação do HPV com neoplasias benignas e malignas da cavidade oral, também tem sido investigada. Dos mais de 100 tipos identificados, 24 foram encontrados nesta cavidade, destacando-se os tipos 6 e 11 que estão envolvidos em lesões benignas orais e 16 e 18, possivelmente envolvidos na etiologia de determinados carcinomas, principalmente o carcinoma escamoso bucal (DOORBAR, 2005).

O HPV apresenta especificidade pela pele e mucosa epitelial causando condilomas, papilomas e neoplasias. Estima-se que 75% da população sexualmente ativa entrem em contato com um ou mais tipos de HPV durante a vida, no entanto, a grande maioria destas infecções é eliminada pelo sistema imunológico não determinando sintomas no hospedeiro. Estudos atuais revelam que existe eliminação espontânea do vírus, através da ativação de mecanismos imunológicos em mais de 90% dos indivíduos infectados num período de 24 meses. Em relação à cavidade bucal, sabe-se que a integridade da mucosa desempenha papel preponderante na defesa do organismo, impedindo a penetração de patógenos. A mucosa por sua vez, faz continuidade com vários tecidos tornando-os particularmente vulneráveis se a defesa oral é rompida (LEHNER, 1996a).

Os mecanismos regulatórios que influenciam no ecossistema oral, estão associados à presença da imunoglobulina A secretória (SIgA) na saliva, que constitui o isotipo predominante das secreções, e é considerada a primeira linha de defesa do hospedeiro contra patógenos, como por exemplo o HPV, que colonizam ou invadem as estruturas anatômicas banhadas por secreções (LAVOIE & MARCOTTE, 1998).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1- PAPILOMAVÍRUS HUMANO NA CAVIDADE BUCAL

A boca, colonizada por microorganismos desde o nascimento do ser humano, representa uma porta de entrada para inúmeras infecções. Dentre os microorganismos que acometem a cavidade oral, o Papilomavírus humano tem sido apontado como agente etiológico de diferentes patologias orais. O papiloma escamoso oral, lesão papilar mais comumente freqüente da mucosa bucal (REGESI *et al.*, 2000), representa aproximadamente 3% das lesões orais submetidas à biópsias e, é encontrada em 4 para cada 1.000 adultos. Entre as lesões malignas, o carcinoma de células escamosas oral é a mais comum, representando 94% dos cânceres orais (NEVILLE *et al.*, 1998).

Na população adulta branca dos Estados Unidos, o carcinoma oral é uma das 25 lesões de mucosa oral mais freqüentemente detectadas, e aproximadamente 21.000 casos novos são diagnosticados anualmente. Pouco mais de 6.000 americanos morrem dessa doença a cada ano, é o sexto tipo de câncer mais comum em homens e o 12º mais comum em mulheres, na razão homem-mulher de 3:1. A taxa de incidência anual da doença é de 7,7 nos EUA e assim como em outros carcinomas, o risco do carcinoma intra-oral aumenta com a idade (NEVILLE *et al.*, 1998).

Foi sugerido que a prevalência do HPV inclui infecções subclínicas e/ou latentes e que a infecção com um baixo número de cópias do vírus é comum na cavidade oral. Entretanto, a prevalência média de HPV na mucosa oral tem sido descrita variando de 20 a 30% (MILLER & WHITE, 1996), em indivíduos entre 15 e 49 anos de idade (BREITENBACH *et al.*, 2002). Os tipos 6, 11, 16 e 18 são os mais prevalentes na cavidade bucal, nas regiões anal e genital, o que talvez possa significar uma transmissão orogenital (PRAETORIUS, 1997). Esta prevalência e a freqüência deste vírus na cavidade bucal variam de acordo com sítios anatômicos, tipo de lesão e método de diagnóstico, porém lesões papilomatosas relacionadas ao HPV na mucosa bucal são

incomuns. De acordo com Lazzari e colaboradores (2004) em um estudo realizado para verificar a frequência do DNA-HPV em lesões do epitélio oral de 80 pacientes, verificou-se uma baixa prevalência do HPV em lesões orais com uma frequência de 11,3%. Summersgill e colaboradores (2001) em um estudo que avaliou a frequência de HPV na cavidade oral de crianças e adolescentes detectaram que 6% (16/268) dos participantes apresentaram positividade para este vírus na boca. Crianças com 6 anos de idade ou menos, demonstraram taxa de positividade de 8,7% quando comparada com a taxa de 5,2% em adolescentes de 13 anos. Em contraste com estes resultados, adultos normais (21-84 anos) demonstraram uma frequência de positividade para o HPV de 11% utilizando-se as mesmas técnicas laboratoriais.

2.1.1-CLASSIFICAÇÃO

Atualmente já foram descritos mais de 100 tipos de HPV (HOWLEY & LOWY, 2001), e destes, cerca de 24 estão associados a lesões de cabeça e do pescoço (NEVILLE *et al.*, 1998). O tipo mais prevalente, tanto em lesões orais como em lesões genitais é o 16 (BOUDA *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2003). Quanto ao potencial de malignidade, classificam-se como de alto risco os HPV-16, 18, 31, 33, 35 e 55; os de médio risco, HPV - 45 e 52 e de baixo risco, os HPV - 6, 11, 13 e 32 (KIGNEL, 2005). Tem sido relado que o HPV-16 é o mais freqüentemente identificado tipo viral em carcinomas de células escamosas oral, e os tipos 16 e 18 desempenham papel importante na transformação maligna para esta lesão (KAMEYAMA *et al.*, 2003).

Kameyama e colaboradores (2003) em um estudo que avaliou a presença do HPV na cavidade oral de crianças entre 3 e 5 anos de idade, verificaram que o HPV 16 foi o tipo mais prevalente entre crianças de 5 anos, e o tipo 2 o mais prevalente entre crianças de 3 anos, sugerindo que a prevalência e a frequência dos vários tipos de HPV nesta cavidade variam com a idade e podem está associadas com a resposta imune e influências hormonais do hospedeiro. Terai e colaboradores (1999) ao avaliar a prevalência do Papilomavírus humano em mucosa oral

normal, detectaram que o tipo 18 foi o mais prevalente (86,7%). O HPV 6b, considerado de baixo risco, tem sido descrito por muitos autores e parece ser um tipo comum observado em lesões da cavidade bucal.

2.1.2-MORFOLOGIA VIRAL

O Papilomavírus humano é membro da família *Papillomaviridae*, gênero *Papillomavirus* (HOWLEY & LOWY, 2001; SANTOS *et al.*, 2002; ROSENBLATT *et al.*, 2005). São vírus pequenos, não envelopados, medindo aproximadamente 55 nm de diâmetro. O seu genoma é composto por um DNA de fita dupla circular, envolvido por capsídeo icosaédrico constituído por 72 capsômeros (HOWLEY, 1990; SHAH & HOWLEY, 1990; REGESI *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002) e com aproximadamente 7200-8000 pares de bases (pb) (HOWLEY, 1990; SHAH & HOWLEY, 1990). (Figura I).

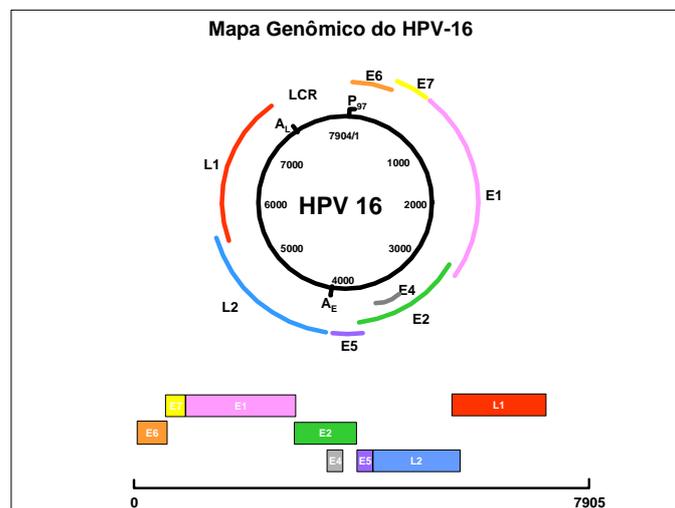


Figura I. Organização genômica do HPV-16. O Genoma do HPV-16 consiste de dupla fita de DNA de aproximadamente 8 kB. A LCR (Região Controladora Longa), regula a expressão gênica viral. Os genes E (E1-E7) codificam proteínas que controlam o ciclo viral e os genes L (L1 e L2), codificam proteínas do capsídeo viral (SHAH & HOWLEY, 1990). Organização do genoma (HOWLEY, 1990, modificado).

A hélice do seu DNA contém oito *Open Read Frames* (ORFs) classificados em precoces (E) e tardios (L). A região E do genoma viral que se expressa em células infectadas não produtivas e em células transformadas; codifica as proteínas E1, E2, E4, E5 e E6, que controlam a replicação, transcrição viral e transformação celular (Figura I).

As proteínas E1 e E2 estão relacionadas à replicação viral e formam um complexo em torno do ponto de origem de replicação; E6 e E7 relacionam-se a oncogenicidade, atuam na modulação de atividades de proteínas celulares que regulam o ciclo celular, resultando em uma proliferação celular descontrolada. A oncoproteína E6 acelera os mecanismos de degradação da proteína supressora do crescimento tumoral p53, interferindo nos mecanismos de apoptose e reparo do DNA celular, degrada outras proteínas envolvidas no controle e crescimento tumoral, e induz a telomerase e a imortalização celular. A oncoproteína E7 age na proteína supressora tumoral pRb (*retinoblastoma protein*), também resultando em distúrbios do controle do ciclo celular. A região tardia, composta pelos genes L1 e L2 codifica proteínas relacionadas a produção do capsídeo viral, sendo expressas somente em células com infecção produtiva. A posição, o tamanho e a função de muitos ORFs, são altamente conservados entre os papilomavírus. A região controladora longa (LCR) é a única região que não contém ORF, portanto não codifica proteínas, mas é essencial na regulação da replicação viral e transcrição dos genes celulares e virais. Existe ainda uma região curta não codificadora (SNR) entre E5 e L2, cuja função biológica é desconhecida (RAPAPORT, 2005).

2.1.3-BIOSSÍNTESE VIRAL

A replicação do HPV acontece no núcleo celular de células epiteliais, afetando predominantemente a pele e mucosas, como a mucosa das vias respiratórias superiores, conjuntiva, vagina, cérvix, reto e boca (HOWLEY & LOWY, 2001; SANTOS *et al.*, 2002;). O ciclo de vida produtivo dos HPVs está diretamente relacionado a diferenciação celular epitelial.

As lesões causadas por este vírus possuem características histológicas que refletem as propriedades biológicas do papilomavírus, sendo que as mudanças morfológicas são induzidas por produtos gênicos virais específicos (RAPAPORT, 2005).

Uma vez que a célula basal é a única no epitélio capaz de se dividir, o vírus infecta tal célula para induzir uma infecção persistente. A expressão gênica tardia, a síntese de proteínas do capsídeo, a síntese do DNA e a formação de viriões, ocorrem somente em células epiteliais escamosas em diferenciação terminal. Assim, à medida que a célula se diferencia, há maior produção de antígenos e replicação viral nas células superficiais, de modo que a quantidade de DNA aumenta em direção à superfície do epitélio. Acredita-se que a infecção do papilomavírus ocorre através de micro-traumas ocorridos no epitélio, que expõem as células basais à entrada do vírus (RAPAPORT, 2005). Duas moléculas pertencentes a família das integrinas $\alpha 6\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ presentes na superfície das células basais, foram identificadas como receptores do HPV (GONÇALVES & DONADI, 2004).

Após a entrada do vírus nos queratinócitos da camada basal, o genoma do HPV se estabelece como episomo, aproximadamente cinquenta cópias por célula, que por sua vez se replica em sincronia com o DNA da célula hospedeira. O estabelecimento e a manutenção dos genomas do HPV estão associados à expressão dos genes precoces E6, E7 e E5, que codificam suas respectivas oncoproteínas, assim como as proteínas de replicação E1 e E2. Durante a divisão celular, as células basais deixam a camada basal, migram para a região suprabasal e começam a se diferenciar. Os queratinócitos, por sua vez, terminam seu ciclo celular, logo que são destacados do pavimento membranal; as células infectadas entram na fase S do ciclo celular uma vez atingida a camada suprabasal. A entrada na fase S resulta na amplificação de genomas virais em mil cópias por célula. Paralelamente à amplificação do DNA, existe a síntese das proteínas E1 e E4 juntamente com proteínas do capsídeo (L1 e L2), resultando na formação de viriões infectivos. Subseqüentemente, estes são liberados ao ambiente na camada superior, onde o epitélio é descamado (DOORBAR, 2005; RAPAPORT, 2005).

Nenhum vírion completo foi observado no núcleo de células infectadas, apesar de certa fluorescência ter sido constatada para as proteínas L1 e L2 que podem migrar para o núcleo através do sinal de localização nuclear (ZHOU *et al.*, 1995).

2.1.4-VIAS DE TRANSMISSÃO

Para a sua transmissão, o HPV requer um contato direto com o tecido epitelial. A exposição ao vírus durante o contato sexual (genital-genital, orogenital, anogenital) representa a via de infecção mais comum. O modo de transmissão do condiloma acuminado é através do contato orogenital com um parceiro infectado (REGESI *et al.*, 2000), no entanto para o papiloma escamoso oral o modo de transmissão é ainda desconhecido (NEVILLE *et al.*, 1998; REGESI *et al.*, 2000), embora o contato direto seja considerado como a via de transmissão mais provável (REGESI *et al.*, 2000). Achados dos mesmos tipos de HPV (6, 11, 16 e 18) em mucosa genital e oral são um forte indicativo para a transmissão orogenital e sendo assim, a maioria das infecções por HPV é o produto de uma auto-inoculação de um sítio genital ou oral próprio para o outro (KAMEYAMA, *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004). No entanto, Syrjänen e colaboradores (2006) relataram que o sexo oral parece não ser o modo de transmissão do HPV oral.

Nas lesões cervicais o HPV passa de um indivíduo para outro através do contato direto, sendo a via sexual o modo de transmissão mais importante (CANN *et al.*, 1997), seguida da transmissão vertical de mãe infectada para o recém-nascido (PURANEN *et al.*, 1997), além de outras vias como a manipulação instrumental e intervenções terapêuticas (FERENCZY *et al.*, 1989).

Diversos autores já demonstraram a presença do HPV no líquido amniótico, pele e orofaringe de recém-nascidos em 73% dos casos, no entanto, não se observa muitas crianças com sintomas clínicos (JENSON *et al.*, 1987; KAMEYAMA, *et al.*, 2003). Sendo assim, a infecção da

cavidade bucal por HPV em neonatos pode ser em decorrência de partos normais, contudo, observa-se também a presença deste vírus em recém-nascidos de parto cesariana, o que indicaria outras formas de infecção perinatal, sendo proposto, portanto, infecção transplacentária ou transmissão viral pelo líquido amniótico (SUMMERSGILL *et al.*, 2001; KAMEYAMA *et al.*, 2003).

Outros fatores de risco relacionados a esta via de contaminação como o aumento do contato entre o feto e a mãe em partos prolongados (mais de 10 horas), ruptura de membranas e o uso de instrumentos (fórceps) durante o parto são significantes (PEREYRA & PARELLADA, 2005). Após o período perinatal, mecanismos de transmissão como auto-inoculação de lesões cutâneas, abuso sexual, e ainda mecanismos menos prováveis como roupas, brinquedos e o contato entre pessoas através do beijo, respiração dentre outros são também sugeridos (SUMMERSGILL *et al.*, 2001; KAMEYAMA *et al.*, 2003). Porém, a existência de infecção por HPV na gravidez expõe ao risco de transmissão fetal ao recém-nascido, estando aumentado em condilomas exofíticos extensos durante a fase de expressão ativa, quando as lesões são altamente infectivas. Por outro lado, muitos casos de papilomatose respiratória juvenil ocorrem em crianças de mães que não tinham lesões durante a gravidez, sugerindo que o HPV pode ser transmitido por lesões subclínicas ou latentes. A penetração viral parece ocorrer durante o parto através do contato entre o feto e o trato genital materno. Ao mesmo tempo a infecção intra-uterina por transmissão transplacentária não pode ser excluída. A frequência de transmissão vertical perinatal do HPV (2,8%), sugere que nem o tratamento das lesões de HPV da mãe, antes do parto, protegerão o recém-nascido da aquisição deste vírus (MOUNTS & SHAH, 1984). Estudos recentes têm demonstrado a alta prevalência do HPV na cavidade oral de crianças e adolescentes, sugerindo que o mesmo poderia compor a microbiota indígena do hospedeiro (OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Giraldo e colaboradores (1996) observaram a presença de HPV (6%) na orofaringe de mulheres com HPV genital alertando a possibilidade de existir uma reserva natural deste vírus em outros sítios mucosos que não o genital, podendo os mesmos servirem para uma re-infecção.

2.1.5-PATOGENIA E FATORES DE RISCO PARA A INFECÇÃO POR HPV

A infecção é iniciada quando uma partícula viral penetra em células basais indiferenciadas do epitélio. Mesmo pequenos traumas que ocorram no tecido epitelial, permitem ao vírus penetrar na camada basal deste tecido. Nas células basais e parabasais, o DNA viral replica em baixo nível e apenas genes precoces são transcritos, também em nível baixo. Multiplicação extensiva do DNA viral e transcrição de todos os genes virais, bem como formação do capsídeo, ocorre apenas nas camadas mais superficiais do epitélio. Partículas virais maduras (com capsídeos completos) estão, portanto, ausentes nas células basais, e a replicação está restrita às células nos estratos espinhoso e granuloso. Após a infecção, o HPV pode permanecer latente na camada basal, sem causar qualquer alteração patológica ou lesão diagnosticável (FRANCO, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2003; ROSENBLATT *et al.*, 2005). Acredita-se que nessa fase da infecção, o DNA viral encontra-se na forma de epissoma, aparentemente não funcional e replica-se apenas uma vez a cada ciclo celular. Não se sabe quanto tempo o vírus pode permanecer nesse estado nem quantos casos progridem dessa forma de infecção, provavelmente, fatores imunológicos são determinantes dessa condição (ROSENBLATT *et al.*, 2005).

A infecção latente por HPV se caracteriza pela presença do DNA viral sem apresentar nenhum tipo de lesão. Nessas situações ainda não está confirmado o seu potencial de transmissão e não há indicação de um tipo de tratamento. Entre a doença clínica e a infecção latente há a doença sub-clínica, onde ocorrem alterações celulares sutis (FRANCO, 1997). A progressão da fase de incubação para a expressão ativa depende de três fatores: permissividade celular, tipo viral e estado imune do hospedeiro (CASTRO *et al.*, 2004).

Uma grande variação na incidência de infecção por HPV detectada em mucosa oral normal de indivíduos saudáveis tem sido relatada, numa extensão de 0 % a 81,1% em vários estudos, usando diversos métodos e em um número limitado de indivíduos. Surpreendentemente, o HPV 18 foi o mais freqüente genótipo em mucosa oral normal, e infecções por este tipo viral na cavidade oral sem lesões clínicas sugere, que o mesmo, persistentemente ou freqüentemente, infecta a mucosa oral, a qual pode atuar como reservatório deste vírus. De qualquer modo, permanece indefinido se a infecção por HPV 18 é subclínica e/ou latente e se é uma infecção persistente e/ou transitória por HPV 13 (TERAI *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2003).

Girald e colaboradores (2006a) realizaram um estudo em mulheres infectadas pelo HPV genital observando que 26 das 29 mulheres estudadas foram também positivas para HPV oral (89,7%), sugerindo que pacientes com infecção genital por este vírus podem ser mais predispostas a apresentarem esta infecção em outros sítios mucosos.

As variáveis qualitativas são fatores vinculados ao HPV por estudos epidemiológicos e representam fatores de risco para esta infecção: início precoce da atividade sexual, multiplicidade de parceiros, multiparidade e história de doenças sexualmente transmissíveis (BREITENBACH *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004), baixa escolaridade e renda, paridade elevada (partos não-cirúrgicos), ser jovem, ter hábito de fumar, ser de baixo nível socioeconômico, sendo os dois primeiros fatores os mais consistentes. O estado civil, no estudo de Sellors e colaboradores (2000), mostrou-se como variável importante, uma vez que pacientes casadas apresentaram menor porcentagem de infecção que as mulheres de outros estados civis. É possível se argumentar não ser o estado civil o fator de risco, mas sim o fato das mulheres sem união consensual terem maior número de parceiros sexuais. Entretanto, Dôres e colaboradores (1991) não encontraram essa associação, atribuindo este achado a promiscuidade do parceiro masculino. Ainda existem os fatores de risco considerados menores, como o uso de anticoncepcional oral por muitos anos, deficiências nutricionais, infecção pelo vírus da

imunodeficiência humana, e outras infecções genitais causadas por agentes sexualmente transmissíveis (BREITENBACH *et al.*, 2002).

Apesar do aprimoramento das técnicas de detecção do HPV nas lesões de mucosa oral, o seu envolvimento direto com os carcinomas orais não foi ainda devidamente comprovado. Todavia a sua ação sinérgica com outros carcinógenos químicos e físicos, tais como, o fumo e o álcool, em determinados carcinomas escamosos parece a explicação mais provável para explicar a ação do Papilomavírus humano na carcinogênese oral (OLIVEIRA *et al.*, 2003). Alterações verificadas no sistema imune periférico de pacientes fumantes incluem a elevação do número de células sanguíneas, o aumento do número de linfócitos T citotóxicos, a diminuição do número de linfócitos T auxiliares, discreta supressão da atividade de linfócitos T, significativo decréscimo da atividade de linfócitos *natural killer*, e baixos níveis sanguíneos de imunoglobulinas, exceto IgE (PINTO *et al.*, 2002).

2.1.6-MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Os tipos 2, 6, 11 e 57 estão associados ao papiloma escamoso bucal; 6,11 (NEVILLE *et al.*, 1998; REGESI *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002), 16 (REGESI *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002) e 18 (NEVILLE *et al.*, 1998) ao condiloma acuminado de mucosa bucal; 13 e possivelmente 32 a hiperplasia epitelial focal (NEVILLE *et al.*, 1998; REGESI *et al.*, 2000; SANTOS *et al.*, 2002); 16, 18, 31 e 33 ao carcinoma de células escamosas oral (NEVILLE *et al.*, 1998); 16 e 18 ao carcinoma verrucoso, que é uma variação de baixo grau do carcinoma de células escamosas oral (REGESI *et al.*, 2000). Existem ainda relatos que os tipos 16 e 18 têm sido identificados em algumas leucoplasias orais (NEVILLE *et al.*, 1998).

As lesões orais descritas acima podem ser encontradas na mucosa dos lábios, língua, gengiva, bochecha, palato duro, palato mole e úvula. A sua predileção e manifestações clínicas variam de acordo com o tipo da lesão (NEVILLE *et al.*, 1998; REGESI *et al.*, 2000). O papiloma

escamoso é uma lesão flácida, indolor, pedunculada, com numerosas projeções que dão uma aparência de couve-flor; o condiloma tende a ser maior que o papiloma sendo uma lesão múltipla e aglutinada; a hiperplasia epitelial focal apresenta-se como lesões individuais e pequenas com aparência pavimentada ou fissurada; o carcinoma de células escamosas oral tem uma apresentação clínica variada, incluindo: lesão exofítica, endofítica, leucoplásica e/ou eritroplásica, podendo haver destruição do osso subjacente (NEVILLE *et al.*, 1998).

2.1.7-HISTOPATOLOGIA

As características histopatológicas comumente apresentadas na maioria destas lesões são: epitélio de revestimento maduro e diferenciado, com projeções papilares, células espinhosas apresentando núcleos cercados por zonas claras (coilócitos) (NEVILLE *et al.*, 1998; REGESI *et al.*, 2000). Caracterizam-se pela presença de grandes vacúolos perinucleares, disceratose representada pela queratinização imperfeita de células epidérmicas isoladas e a discariose que é uma anomalia nuclear como, hipercromatismo, irregularidades da forma e aumento do número de núcleos por célula, sem aumento apreciável do citoplasma ou do contorno celular. Além destes aspectos microscópicos característicos da infecção por HPV, alguns autores acrescentam células superficiais e intermediárias alargadas, bordas citoplasmáticas irregulares, zona perinuclear de citoplasma claro, disqueratose, e discariose, núcleos gigantes com bi ou multinucleação (JACYNTHO *et al.*, 1987).

2.1.8-RESPOSTA IMUNE

As superfícies epiteliais da mucosa da boca e dos tratos respiratório e reprodutivo possuem sistemas imunes especializados, conhecidos coletivamente como tecido linfóide associado à mucosa (MALT). As células epiteliais dessas superfícies, bem como da pele, são

dispersas em uma densa rede de células dendríticas, as quais, na pele, são chamadas de células de Langerhans. As células estromais do MALT e, em particular, dos tecidos linfóides associados ao intestino (GALT), que são uma parte do MALT, secretam a citocina TGF- β que induz a secreção de IgA. Além disso, durante o desenvolvimento fetal, células T $\gamma\delta$ deixam o timo e migram para essas barreiras epiteliais (JANEWAY *et al.*, 2002a). Sendo assim, o MALT consiste de várias populações de células linfóides, incluindo as células de Langerhans. Estas células bem como os queratinócitos do epitélio cervical expressam moléculas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, e participam ativamente da apresentação de antígenos. Aparentemente, a infecção cervical por HPV causa uma disfunção imune local, com uma diminuição de células apresentadoras de antígenos (APCs) e linfócitos T. Desta forma, pode-se inferir que a infecção por HPV pode interferir nos mecanismos de vigilância imune, tanto na fase de indução (apresentação de antígenos) como na fase efetora (ativação de linfócitos T citotóxicos e produção de anticorpos pelos linfócitos B) (GONÇALVES & DONADI, 2004).

As APCs capturam o antígeno no epitélio e se deslocam para os nódulos linfáticos, ativando os linfócitos T CD4 que se diferenciam e se multiplicam. O aumento do número destas APCs é resultante da ação do fator de necrose tumoral (TNF- α) produzido pelos queratinócitos, porém em infecções provocadas pelo HPV há uma diminuição na síntese desta citocina, bem como da expressão da molécula co-estimulatória B7.1, resultando em um decréscimo da capacidade de apresentação de antígenos. Da mesma forma que em lesões cervicais de alto grau, observa-se um aumento no número de macrófagos e um decréscimo das células de Langerhans. O contrário é observado em tecidos não infectados. A presença de macrófagos pode ser um indutor de regressão da lesão, pois eles participam da resposta imune protetora; este fato torna-se evidente através do seu papel no controle negativo da transcrição de genes que codificam as oncoproteínas E6 e E7 do HPV, além da ação antitumoral em células infectadas (SCOTT *et al.*, 2001; GONÇALVES & DONADI, 2004).

Além do TNF- α outras citocinas participam da resposta imune a infecções por HPV. Os interferons (IFN- α e IFN- β) são citocinas produzidas pelas células infectadas, atuam combatendo a replicação viral nas células do hospedeiro e ativam a síntese de moléculas do MHC de classe I, facilitando a apresentação de epítomos virais e aumentando a capacidade citotóxica de linfócitos T CD8 e células *natural killers* (NK). O IFN- γ produzido por linfócitos T e células NK induzem a expressão moléculas do MHC de classe II na superfície de queratinócitos e monócitos/macrófagos permitindo que estas células atuem como APCs, além de bloquear a expressão do RNA mensageiro (RNAm) de células derivadas de câncer cervical. O fator de crescimento tumoral (TGF- β) é produzido por células epiteliais e inibe a proliferação de células infectadas por HPV, por desempenhar um importante papel imunossupressor, podendo ou não inibir a expressão do RNAm que codifica as proteínas virais E6 e E7. Em associação a estas citocinas, observam-se também as células NK desempenhando a resposta imune inata ao HPV (SCOTT *et al.*, 2001; GONÇALVES & DONADI, 2004).

A resposta imune inata é rapidamente induzida, não específica e não gera memória. Dela participam monócitos, macrófagos, células NK e células apresentadoras de antígenos (TEWARI & DISAIA, 2002), em associação com diversas citocinas descritas anteriormente. O escape dos mecanismos de defesa da imunidade inata pelos vírus pode representar um crescimento de células infectadas por HPV, persistência viral, progressão da doença e/ou transformação maligna (SCOTT *et al.*, 2001).

Como o HPV se limita apenas a infectar a camada epitelial, não ultrapassando a membrana basal, a exposição imunológica primária deve ocorrer através de mecanismos existentes nesta camada (STANLEY, 1999). A membrana celular infectada expressa somente a proteína E5, e esta pequena quantidade de antígenos virais de superfície pode permitir a atenuação da resposta imune. A E5 se liga e inativa a proteína necessária para processar antígenos para a apresentação dos complexos de histocompatibilidade tipo II (TEWARI & DISAIA, 2002). Como a célula epitelial não é boa apresentadora de antígenos, o HPV permanece dentro dela sem

ser reconhecido pelo sistema imunológico. Devido ao fato do HPV não causar lise ou morte da célula do hospedeiro, o vírus permanece isolado do contato de células do sistema imune (monócitos, células dendríticas e macrófagos) que inicia o processo de reconhecimento imune. Os eventos necessários para a indução da resposta imune ocorrem da mesma maneira em lesões induzidas por HPV de baixo e alto risco, e em lesões externas e internas (STANLEY, 1999).

Os vários componentes envolvendo o reconhecimento e fase efetora da resposta imune adaptativa epitelial têm sido demonstrados em tecidos cutâneo e mucoso infectados pelo HPV. Dentre estes estão as células de Langerhans, que capturam antígeno e apresentam às células T “naive” nos linfonodos; expansão clonal de células T em tecido epitelial infectado via citocinas e moléculas de adesão; e células acessórias como macrófagos. A resposta imune adquirida gera células efectoras antígeno-específicas: linfócitos T auxiliares CD4+, linfócitos T citotóxicos CD8+ e linfócitos B, e é estimulada pela resposta imune inata. Anticorpos contra as proteínas do capsídeo viral e linfócitos T citotóxicos direcionados contra os oncogenes, parecem estar envolvidos na resposta celular e sorológica, resultando na cura clínica da infecção. As oncoproteínas E6 e E7 modulam a resposta aos interferons induzida pela imunidade inata. Sendo assim, supõe-se que o HPV sobrevive através da combinação do escape viral e interferência com esta imunidade (TEWARI & DISAIA, 2002). Apesar da resposta imune celular a infecção pelo HPV na cérvix uterina não estar completamente elucidada, sabe-se que as vigilâncias imunes local e sistêmica podem estar associadas às infecções latentes e que quando há predominância de linfócitos T CD4 estas células favorecem a regressão da lesão ao contrário do aumento do número de linfócitos T CD8, que pode resultar na persistência e progressão da infecção viral (GONÇALVES & DONADI, 2004). Muitos estudos sugerem que a infecção por HPV estimula uma resposta Th1 e em estudos experimentais de vacinação em ratos, a resposta imune a esta infecção é caracterizada pela secreção de citocinas de células Th1 (IFN- γ , Il-1). A concentração de células da resposta Th1 é importante para o *clearance* da infecção por HPV e a falta desta

resposta pode estar associada à persistência da infecção, ou desenvolvimento de neoplasia (SCOTT *et al.*, 2001).

Jenson e colaboradores (1991) relataram que em animais infectados simultaneamente por mais de um tipo de papilomavírus ocorrem regressões espontâneas das lesões papilomatosas induzidas pelo mesmo tipo viral, sugerindo que a resposta imune celular é tipo-específica.

Assim como a resposta celular, a resposta imune humoral é tipo-específica, leve e transitória, não havendo relatos na literatura que mostrem a relação entre a intensidade dessa resposta e a evolução clínica das lesões, parecendo não apresentar ação sobre os mecanismos de imunovigilância, uma vez que, títulos de anticorpos similares são observados em pacientes com e sem remissão espontânea. Sugere-se que isso ocorra porque os anticorpos formados contra o capsídeo viral e as células B estão presentes na corrente sanguínea, sem acesso às partículas virais que estão no interior das células epiteliais (TORACINI, 2005). Desta forma, a polarização para Th2 está associada a uma resposta imune celular deficiente contra o HPV, que pode facilitar a progressão tumoral (GONÇALVES & DONADI, 2004). Sendo assim, a resposta celular parece desempenhar maior importância no controle da infecção pelo papilomavírus, uma vez que estudos que avaliam lesões com remissão espontânea observa-se intenso infiltrado linfocitário ao redor dos vasos e no cório (TORACINI, 2005). Além disso, verifica-se também um aumento na prevalência de infecções por HPV em indivíduos imunodeprimidos, como por exemplo, indivíduos renais transplantados e portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (SCOTT *et al.*, 2001).

Estudos que analisam a soroconversão de mulheres que receberam partículas semelhantes a vírus (VLPs-HPV) apresentam 5,7 vezes maior probabilidade de desenvolverem lesões escamosas epiteliais do que mulheres que não soroconverteram, sugerindo que a presença do anticorpo contra o VLP-HPV 16 tem maior relação com a progressão da doença do que com proteção. Também foi observado que a soro-conversão ocorre mais frequentemente entre 6 a 12 meses após a detecção do DNA viral (CARTER *et al.*, 1996). Analisando o curso da resposta

imune humoral e celular ao HPV 16 em mulheres infectadas, Nakagawa e colaboradores (2002) concluíram que ambas as respostas foram observadas na maioria destas mulheres, entretanto, o papel do anticorpo na prevenção de uma infecção secundária é questionável, na medida em que a mesma foi observada na presença de altos títulos de anticorpos. Porém, estas mulheres tornaram-se rapidamente negativas para o DNA viral, sugerindo a presença de memória imunológica e demonstrando que a resposta humoral tem papel importante no controle da infecção por HPV. A resposta celular persiste por dias e semanas enquanto que a humoral persiste por meses e anos. A resposta sorológica, principalmente a presença da IgG perdura por um determinado tempo e está associada a um número cumulativo de parceiros sexuais em toda a vida, e não com o número de parceiros atuais, então esta soropositividade representa um marcador de infecção passada (HAGENSEE *et al.*, 2003).

Ao estudar a regressão espontânea de papiloma oral em cães induzido por anticorpos que neutralizam o papiloma canino oral, Ghim e colaboradores (2000) sugerem que a produção de anticorpos pode ocorrer durante a remissão das lesões que podem prevenir uma re-infecção, servindo de base para testes sorológicos, além de demonstrarem o papel da imunidade humoral na prevenção do papiloma oral.

A supressão da resposta imune em humanos induz a ativação da infecção latente ou aumenta a suscetibilidade de reinoculação de infecções ativas resultando em lesões evidentes (BERNARD *et al.*, 2004). Muito se questiona sobre os fatores associados ao desenvolvimento de lesões benignas ou malignas após a infecção pelo HPV, e o motivo pelo qual a infecção pode persistir em alguns indivíduos por muitos anos ou até mesmo por toda a vida. Sugere-se que uma deficiência nos mecanismos intracelulares de imunovigilância seria responsável pelo desenvolvimento das lesões malignas. De acordo com estudos experimentais e relatos na literatura, pacientes imunodeprimidos apresentam um aumento de cem vezes na incidência de carcinoma da vulva e do ânus, no entanto, as lesões induzidas pelo HPV, ocorrem em sua grande maioria, em indivíduos sem quaisquer alterações nos mecanismos imunológicos. As respostas

humoral e celular são importantes na prevenção e regressão das lesões HPV-induzidas. Em situações em que há uma redução da resposta imune celular, como exemplo a gravidez, há uma exacerbação das lesões condilomatosas. Por outro lado, pacientes com a imunidade humoral diminuída, não apresentam alterações na história natural da infecção (PARELLADA & PEREYRA, 2005).

Dillner e colaboradores (1989) analisaram a presença da IgA contra o papilomavírus em secreções cervicais de pacientes com neoplasia intraepitelial cervical e sugeriram que a imunoglobulina A contra o HPV pode ser utilizada como um marcador para a neoplasia intraepitelial cervical, e 6 de 24 mulheres que apresentaram os exames colposcópicos e citológicos normais apresentaram IgA anti-HPV em suas secreções cervicais.

Em um estudo designado para caracterizar a resposta de IgA em secreções vaginais e no soro de mulheres contra proteínas do capsídeo do HPV 16, em comparação com a resposta de IgG no soro, Galloway e colaboradores (2003) detectaram que a IgA nas amostras de secreção vaginal foi observada em 87,3% das mulheres 18 meses após a primeira infecção que coincidiu com IgG no soro. A IgA no soro se desenvolveu mais lentamente que a IgA da secreção cervical e IgG do soro, com uma média de 19,1 meses, e baixa porcentagem de mulheres desenvolveram a IgA no soro (47,7%). No soro observou-se 50% de soroconversão com 14 meses, sendo que, a conversão da IgA no soro foi mais lenta que a conversão desta imunoglobulina na secreção cervical, e a imunoglobulina G no soro apresentou-se mais persistente que a IgA no soro e na secreção cervical, porém não houve diferença significativa na persistência da IgA na secreção cervical e no soro. Mas, observou-se que a permanência deste vírus na mucosa genital parece ser um importante fator para a manutenção da produção de IgA na secreção cervical e soro e IgG no soro, uma vez que os níveis destas imunoglobulinas foram maiores naquelas mulheres em que a presença do vírus se fez presente em visitas consecutivas.

Embora uma resposta imune celular e humoral ao HPV seja manifestada pelo hospedeiro, a presença de infecção crônica sugere que o vírus escapa destes mecanismos de defesa

imunológico sendo necessários mais estudos para maiores esclarecimentos a respeito da resposta do hospedeiro frente a uma infecção pelo Papilomavírus humano (TEWARI & DISAIA, 2002).

2.1.9- DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Para o diagnóstico das infecções causadas pelo HPV existe uma variedade de exames complementares que auxiliam na identificação das lesões. Entre os testes mais utilizados na rotina estão a colposcopia, citopatologia e histopatologia. Mais recentemente, os métodos da biologia molecular têm sido empregados para detecção e tipagem viral. A técnica mais sensível é a reação em cadeia da polimerase (PCR), que permite a detecção de pequeno número de cópias do ácido nucléico genômico empregando *primers* específicos para cada tipo de HPV (SANTOS, *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2003). O diagnóstico de HPV por PCR vem sendo considerado como um possível complemento importante aos diagnósticos cito-histopatológicos e colposcópicos, a utilização deste ensaio específico e sensível em amostras biológicas, é capaz de elucidar as dúvidas originadas do diagnóstico citológico, não apenas de lesões pré-neoplásicas, mas também das infecções subclínicas tanto na mulher como no homem (SICHERO *et al.*, 2005).

A sensibilidade e a especificidade dos métodos baseados em PCR podem variar dependendo do conjunto de iniciadores utilizados. Os protocolos mais amplamente utilizados empregam iniciadores consenso e degenerados complementares a uma região altamente conservada do gene L1, e que são potencialmente capazes de detectar todos os tipos de HPV que infectam as mucosas. Entre estes, estão o par único de iniciadores consenso GP5/6 e sua versão estendida GP5⁺ /6⁺, e os iniciadores degenerados MY09/11 e sua versão modificada PGMY09/11 (SICHERO, L. *et al.*, 2005). Demonstrou-se maior eficiência na detecção de DNA do HPV com os iniciadores MY09/11 em relação aos iniciadores GP5⁺ /6⁺ usando-se como alvo DNA extraído de material fresco (KIRNBAUER *et al.*, 1994). No entanto, Liebert e

colaboradores (2004), comparando a eficiência dos iniciadores MY09/11 e GP5⁺ /6⁺ para a detecção do papilomavírus em mucosa oral, verificou maior sensibilidade para os últimos.

Outro método de diagnóstico da biologia molecular utilizado para a detecção do HPV é representado pela captura híbrida, que é de fácil execução e leitura, e não é influenciado por condições locais como presença de infecção, inflamação, atrofia ou sangue (BORGES *et al.*, 2004). Estes métodos descritos anteriormente são utilizados para otimização de recursos, melhora diagnóstica e monitoramento terapêutico (DÔRES, *et al.*, 2005).

O tratamento de lesões orais por HPV como o condiloma, papiloma ou verruga pode ser clínico ou cirúrgico, cujo objetivo é a remoção da lesão visível. Pode ocorrer recidiva das lesões em locais previamente tratados e em outros, com incidência entre 20 a 30% dos casos (CASTRO *et al.*, 2004).

2.2 - MUCOSA BUCAL E RESPOSTA IMUNE

2.2.1-SECREÇÃO SALIVAR

2.2.1.1- CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os fatores essenciais para a imunidade da cavidade oral são representados pela integridade da mucosa e funções dos componentes salivares. A saliva é um complexo de fluidos provenientes das glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e menores, fluido gengival, fluido crevicular, detritos celulares e microorganismos da cavidade oral. Sua produção diária varia entre 1 a 1,5L. Contém 99% de água e constituintes como proteínas, glicoproteínas, vitaminas, hormônios, uréia, íons que podem ser originários das glândulas salivares ou transferidos do plasma. É responsável pela lubrificação e proteção dos tecidos orais, apresenta ação e barreira contra agentes irritantes, manutenção da integridade dental, digestão e

limpeza das estruturas bucais. (LAVOIE & MARCOTTE, 1998; MADRID *et al.*, 2000; SUGAWARA *et al.*, 2003). A concentração dos seus componentes varia de acordo com o fluxo salivar. Geralmente um aumento discreto nas taxas de secreção salivar, gera um aumento de sódio, bicarbonato e do pH, diminuindo o potássio, cálcio, fosfato, cloro, uréia e proteínas (LAVOIE & MARCOTTE, 1998). A saliva também contém agentes antimicrobianos, imunoglobulinas, proteínas (glicoproteínas, aglutinina, estaterina), mucina, lactoferrina, enzimas (lizozima e peroxidase) e peptídeos antimicrobianos (LEHNER, 1996b; SUGAWARA *et al.*, 2003).

O fluido gengival é um exudato originário do plasma que atravessa a junção epitelial lentamente quando a gengiva está saudável, aumentando em decorrência de processos inflamatórios. A sua composição é similar a do plasma contendo: proteínas, albuminas, leucócitos, imunoglobulinas e componentes do sistema complemento (LAVOIE & MARCOTTE, 1998).

O ambiente supragengival da cavidade oral é controlado primeiramente pela saliva. O fluxo contínuo da saliva aumenta pela ação da atividade muscular de lábios e língua removendo certa quantidade de microrganismos dos dentes e das superfícies mucosas. A saliva contém muitos fatores de defesa não-específicos e específicos, a imunoglobulina A é o principal fator de defesa específico da saliva, enquanto que os fatores não-específicos são representados por glicoproteínas salivares não-imunes, mucina, lactoferrina, lisozima, peroxidase, histatina e cistatina. As mucinas são proteínas de alto peso molecular e representam o principal constituinte do muco, que promove uma proteção dos tecidos duros e moles da cavidade oral, uma vez que origina uma camada viscosa, que limita a penetração dos microrganismos no tecido mucoso (LAVOIE & MARCOTTE, 1998).

2.2.1.2- SALIVA COMO FERRAMENTA DE DIAGNÓSTICO

A saliva tem sido utilizada para muitos testes de diagnóstico por favorecer a determinação de uma variedade de componentes incluindo drogas terapêuticas, anticorpos e hormônios esteróides (MADRID *et al.*, 2000; STRECKFUS & BIGLER, 2002; HAGENSEE *et al.*, 2003). As vantagens deste fluido como meio de diagnóstico são muitas, destacando-se: fluido seguro; com baixa infectividade; fácil coleta, econômica e indolor; proporciona maior conforto para o paciente, principalmente nos casos de pacientes geriátricos, psiquiátricos, crianças e obesos; conveniente em estudos epidemiológicos, uma vez que, riscos ocupacionais associados a injúrias durante a coleta do sangue são eliminados. É, portanto de fácil obtenção, ao contrário do sangue que em muitas situações é dificultada devido a fatores culturais ou religiosos e que exige um sistema mais complexo de armazenamento e coleta (MADRID *et al.*, 2000; STRECKFUS & BIGLER, 2002; HAGENSEE *et al.*, 2003). Todas estas vantagens permitem que este fluido corpóreo represente uma alternativa em relação ao sangue e urina (MADRID *et al.*, 2000; STRECKFUS & BIGLER, 2002; HAGENSEE *et al.*, 2003).

Nos últimos anos a utilização da saliva para diagnóstico tem apresentado resultados satisfatórios. Novas tecnologias têm sido desenvolvidas para a sua utilização como meio de diagnóstico e prognóstico das doenças (STRECKFUS & BIGLER, 2002). Porém, apesar da saliva ser um fluido corpóreo altamente conveniente para ser coletado e analisado, apresenta baixas concentrações de determinadas imunoglobulinas em relação ao soro. Sendo assim, técnicas laboratoriais com o objetivo de melhorar a sensibilidade para a detecção de anticorpos virais têm sido desenvolvidas, destacando-se a radio-imunoprecipitação, Western blotting, hemaglutinação passiva e imunoensaios de captura de anticorpos (BAGG *et al.*, 1991). Recentemente, estudos especializados têm sido desenvolvidos com o objetivo de coletar saliva para a detecção de anticorpos contra agentes infecciosos virais tais como o Vírus da Imunodeficiência Adquirida

(HIV) tipos 1 e 2; Hepatite viral, Dengue, Sarampo, Rubéola e outros (SCHRAMM *et al.*, 1999; ZMUDA *et al.*, 2001; GRANADE *et al.*, 2002; GUZMÁN, *et al.*, 2003).

Pesquisas em que demonstram a presença de HPV oral vêm sugerindo a utilização da saliva como forma de detectar a presença de anticorpos contra o referido vírus. Os ensaios imunológicos mais utilizados para estas investigações são: Ensaio Imunoenzimático (ELISA), Western blotting e imunoprecipitação. Apesar da sensibilidade relativamente baixa, os estudos têm encontrado anticorpos contra os VLPs e algumas proteínas de expressão precoce. A frequência e o título de diversos tipos de anticorpos gerados contra o HPV mostram uma grande variabilidade que é dependente do tipo de HPV infectante, do epítipo reconhecido, do tipo de amostra e da sensibilidade do ensaio (ZMUDA *et al.*, 2001).

Ao analisar a presença de anticorpos específicos IgG anti-HPV na saliva, Hagensee e colaboradores (2003), justificam que apesar da IgA apresentar-se em maiores concentrações neste fluido, o padrão ouro utilizado em estudos deste vírus é a imunoglobulina G, por permanecer um maior tempo no organismo que a imunoglobulina A. Além deste fato, observa que as taxas de oropositividade foram menores que as taxas de soropositividade indicando que ensaios utilizando o fluido oral podem regularmente apresentar resultados falso negativos. Isto pode ocorrer, devido à diferença na resposta imune aos diferentes tipos virais. Porém a resposta de anticorpos na saliva pode ser comparada à resposta de anticorpos da cérvix uterina, uma vez que, a resposta imune ao HPV é comum para estas mucosas. Outro fator relevante que deve ser considerado quando se utiliza a saliva para identificar anticorpos anti-HPV é que o controle negativo ainda não está bem definido, uma vez que amostras de crianças utilizadas como controle negativo apresentam forte reatividade de anticorpos orais contra este vírus. Sendo assim, os autores sugerem que mais estudos sejam realizados na otimização deste ensaio como uma alternativa de ferramenta epidemiológica segura e não invasiva. Destacam o fato deste fluido conter bactérias que produzem proteases capazes de degradar os anticorpos presentes e mucina que pode dificultar a pipetagem. Além disso, sugerem que a infecção pelo HPV na cavidade oral não

desempenha papel significativo para a detecção de anticorpos, devido a baixos títulos de imunoglobulinas observados nas amostras de saliva neste estudo. Mas, concluem que a resposta humoral, representada por anticorpos salivares, pode ser comparada à resposta de anticorpos da cérvix uterina em mulheres devido a possibilidade de uma resposta imune comum das mucosas.

2.2.1.3- IMUNOGLOBULINA “A” E SEU MECANISMO DE AÇÃO

A imunoglobulina A é o principal isotipo encontrado na saliva e em todas outras secreções. É produzida por células plasmáticas que estão localizadas nos ductos e ácinos das glândulas salivares. Apresenta-se como uma molécula polimérica, composta de dois monômeros, cadeia J, e componente secretor (SC). Cada monômero é formado por quatro polipeptídeos, duas cadeias pesadas e duas cadeias leves ligadas covalentemente por pontes dissulfeto. A cadeia J e o SC são ligados a região Fc da molécula de IgA. A cadeia J é um polipeptídeo sintetizado no citoplasma celular e está envolvido na iniciação da polimerização desta imunoglobulina. O SC é uma proteína glicosilada produzida pelas células epiteliais de mucosa, que estabiliza a estrutura polimérica da IgA e a protege do ataque proteolítico das secreções (Figura II). Em humanos, há duas subclasses de IgA, IgA1 e IgA2, que se apresentam em proporções similares na saliva e em outras secreções. Estas diferem em apenas 22 aminoácidos de cadeia pesada (LAVOIE & MARCOTTE, 1998; JANEWAY *et al.*, 2002c).

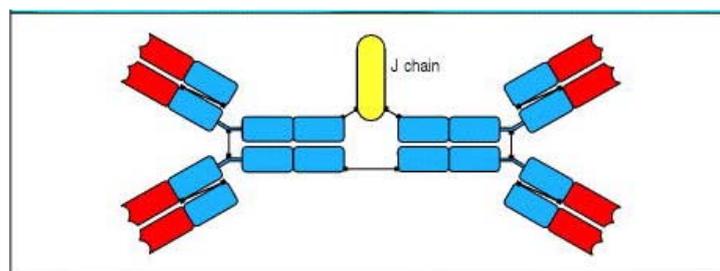


Figura II. IgA dimérica. Os monômeros apresentam-se em associação com uma cadeia polipeptídica adicional (J), que são unidos por ligações dissulfídicas (JANEWAY *et al.*, 2002b).

Certamente a IgA é a imunoglobulina, quantitativamente, mais importante secretada na saliva pela parótida, e a proporção de IgA/IgG é 400 vezes maior do que a proporção correspondente no soro (LEHNER, 1996a). Desempenha papel importante na proteção contra patógenos em sítios mucosos (GALLOWAY *et al.*, 2003). Estudos de imunofluorescência têm demonstrado que a IgA é produzida pelos plasmócitos presentes nas glândulas salivares, e esta em grande parte é dimérica diferentemente da convencional monomérica presente no soro (LEHNER, 1996a).

A resposta contra antígenos orais pela IgA salivar pode ser induzida através de dois mecanismos. Um deles se baseia na hipótese que os antígenos orais podem estimular a proliferação e diferenciação de células linfóides localizadas nas glândulas salivares. Estas por sua vez, contêm tecido linfóide, constituído por macrófagos, células T e B, os quais podem agir diretamente contra os antígenos. Estes antígenos podem penetrar nos ductos glandulares pelo fluxo retrógrado natural e entrar em contato com células do sistema imune através do mecanismo de endocitose realizado pelas células do epitélio ductal. Eles então são capturados pelos macrófagos e apresentados às células T e B. O outro mecanismo de resposta envolve a migração das células B precursoras de IgA sensibilizadas pelo antígeno do tecido linfóide associado a mucosa do intestino (GALT) para as glândulas salivares. O GALT é composto por numerosos linfonodos e placas de Peyer ricas em células B precursoras da IgA que tem o potencial de povoar tecido linfóide a distância. Após a apresentação dos antígenos as células T e B deixam o GALT através dos vasos linfáticos eferentes, e alcançam o sangue periférico através do ducto torácico. Então as células T e B migram da lâmina própria do intestino, pulmões, trato geniturinário e glândulas secretoras onde são seletivamente mantidas. Neste tecido mucoso e glandular as células B precursoras sofrem expansão e maturação em células plasmáticas produtoras de IgA, sob o estímulo das células T. Este mecanismo de resposta imune de mucosas, sustenta a idéia da existência de um sistema imune de mucosa que apresenta IgA específica nas secreções glandulares não sendo, portanto, estimuladas por antígenos diretamente no local.

Sendo assim, estudos experimentais com animais e humanos têm demonstrado que a administração de antígenos orais induz a secreção de imunoglobulina A específica na saliva e em outras secreções. Desta forma, a IgA contra antígenos inalados tem sido detectada em várias secreções incluindo a saliva. No entanto, as glândulas salivares contêm células linfóides que são necessárias para gerarem uma resposta de IgA independente do MALT, porém pode ser possível que a indução de IgA na saliva envolva uma estimulação antigênica inicial em sítios indutores (GALT ou NALT), seguido de uma estimulação antigênica local nas glândulas salivares para haver a expansão de células plasmáticas (LAVOIE & MARCOTTE, 1998).

A IgA secretória (SIgA) apresenta funções biológicas que se destacam como a inibição da aderência bacteriana, inativação de enzimas e toxinas bacterianas, ativação do sistema complemento, neutralização viral dentre outros. Sabe-se que comparada com a IgG e IgM, a IgA é pobre ativadora do complemento, mas em contrapartida, este anticorpo desempenha papel fundamental no mecanismo de exclusão imune, uma vez que limita a penetração de material antigênico através do epitélio mucoso, facilitando a remoção do mesmo das superfícies mucosas. O papel que a SIgA desempenha na imunidade viral, consiste em sua presença no sítio de contato inicial entre o vírus e o hospedeiro. Estudos *in vitro* têm demonstrado que o vírus da imunodeficiência tipo 1 pode ser neutralizado pela SIgA, mas os mecanismos envolvidos na inativação viral são complexos e ainda não muito bem compreendidos. Sabe-se que esta imunoglobulina previne a penetração de vírions nas células epiteliais pelo bloqueio de suas adesinas (LAVOIE & MARCOTTE, 1998), e os mecanismos de neutralização viral estão diretamente relacionados ao número de anticorpos por vírus (ARMSTRONG & DIMMOCK, 1992).

Os níveis de IgA são baixos na saliva durante os primeiros meses de vida e são estabilizados após 12 a 24 meses, estes por sua vez, podem variar de acordo com o fluxo salivar, idade, fatores hormonais, tabagismo, estado emocional, práticas de atividade física e fatores genéticos. A sua titulação é inversamente proporcional ao fluxo salivar e estudos têm

demonstrado que baixos níveis de IgA estão associados a alta atividade ou suscetibilidade á caries e que a remoção do tecido cariado representa um aumento nos níveis de IgA para o *Streptococcus mutans* na saliva. Esta concentração varia consideravelmente de acordo com o tempo, e o momento exato de desenvolvimento da resposta imune contra o desafio antigênico não é conhecido. A SIgA presente na saliva pode refletir a presença de antígenos ou uma estimulação passada. Em estudos sorológicos, foi observado que a resposta sérica de IgA é HPV tipo-específica, entretanto é menos estável através do tempo que a resposta de IgG. Assim, ensaios de medida da IgA sérica podem ser usados como marcadores de infecção ativa ou recente, ou até mesmo como um marcador prognóstico, e os níveis de IgG medidos, podem refletir não apenas infecções recorrentes, mas também infecções passadas (SICHERO, *et al.*, 2005).

Existem fatores que contribuem para a variação das imunoglobulinas no soro e na saliva como raça, genética e idade, sendo que a concentração de IgA aumenta ao longo da vida. Esta imunoglobulina pode ser detectada na saliva com três semanas de idade, porém a IgG está presente em altas concentrações no nascimento, decorrente da IgG materna que atravessa a barreira placentária, mas decresce após dois meses de idade. A IgE aumenta rapidamente atingindo a sua maior concentração antes dos 10 anos de idade e decresce durante a adolescência (GRUNDBACHER, 1988).

3 JUSTIFICATIVAS

O HPV tem sido apontado como possível agente etiológico de diferentes patologias orais. No entanto, a via de infecção do HPV oral é ainda desconhecida (NEVILLE *et al.*, 1998; REGESI *et al.*, 2000). O contato direto (REGESI *et al.*, 2000) e a autotransmissão têm sido sugeridos como possíveis vias por alguns pesquisadores (KAMEYAMA, *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004).

Considera-se que fatores externos, em conjunção com o HPV, modulam o risco da infecção por este vírus, assim como a resposta imunológica do hospedeiro (CLERICI *et al.*, 1997). Os mecanismos de defesa imune da cavidade bucal, frente a uma infecção viral pelo HPV, têm sido investigados. Em especial, as imunoglobulinas, especificamente a IgA secretória presente na saliva, é atualmente alvo de investigações baseadas em sua capacidade de inibição da infectividade viral (HAGENSEE *et al.*, 2000; GRANADE *et al.*, 2002; ZMUDA *et al.*, 2001).

Desta forma, identificar a presença do HPV nas células da mucosa bucal de pacientes com infecção cérvico-vaginal e avaliar potenciais fatores de risco para a infecção por HPV oral, contribuiria para esclarecer a possibilidade da autotransmissão. Bem como determinar a presença da IgA com especificidade para o HPV na saliva elucidaria o papel da imunidade humoral na cavidade bucal frente a este tipo de infecção.

Neste sentido, este estudo poderá contribuir para o conhecimento dos mecanismos da patogenia do HPV, a relação deste vírus com lesões orais, e o papel imunológico humoral nestas pacientes.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a presença do HPV, nas células da mucosa bucal, assim como a presença da imunoglobulina A específica na saliva, de pacientes com antecedentes de infecção cérvico-vaginal por este vírus.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Utilização da Reação em cadeia da polimerase (PCR) para detectar a presença do HPV nas células da mucosa bucal de mulheres com infecção cérvico-vaginal;
- 2- Detectar a presença de IgA anti-HPV na saliva destas mulheres, através da Imunofluorescência indireta;
- 3- Registrar e avaliar os possíveis fatores de risco (idade, estado civil, escolaridade, tabagismo, etilismo, frequência de escovação dentária, uso do fio dental, uso de enxaguatórios bucais, idade da coitarca e prática de sexo oral) para a prevalência do HPV nesta amostragem.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 AMOSTRAGEM

O presente estudo foi realizado em pacientes procedentes do ambulatório de Ginecologia do Hospital Santo Antônio da cidade de Salvador, Bahia, Brasil, no período de agosto de 2004 a junho de 2005. Foram selecionadas 100 pacientes do sexo feminino, com média de idade $28,91 \pm 8,7$ anos (14-59 anos), vida sexual ativa e diagnóstico histológico de atipias celulares cérvico-vaginal compatíveis com a presença do HPV e não tratadas. As pacientes que participaram do estudo assinaram o termo de consentimento (Anexo I), analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos deste hospital (Anexo III).

As participantes do estudo responderam a um questionário sócio-econômico padronizado (Anexo II) devidamente aplicado por um único entrevistador, para obtenção de informações sobre potenciais fatores associados à infecção pelo HPV.

5.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídas no estudo apenas pacientes do serviço de ginecologia do referido hospital com diagnóstico histológico de atipias celulares cérvico-vaginal, compatíveis com a presença do HPV, não submetidas a terapêuticas e vida sexual ativa.

5.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Mulheres grávidas, mulheres utilizando medicamentos e que não preencheram os critérios de inclusão descritos acima foram excluídas do estudo.

5.2 COLETA DE DADOS E AMOSTRAS

5.2.1 - EXAME FÍSICO INTRABUCAL DE PARTES MOLES

O exame físico intrabucal de partes moles foi realizado de maneira ordenada, examinando-se cada estrutura anatômica na seguinte ordem: lábios (pele, mucosa, semimucosa), fundo de sulco, mucosa alveolar, gengiva inserida, gengiva livre, rebordo alveolar, mucosa jugal, língua, soalho bucal, palato duro, palato mole e orofaringe. Todos os achados clínicos foram transcritos para a ficha de registro (Anexo II).

5.2.2 - SALIVA

Foram realizados bochechos com água mineral para remoção de possíveis restos alimentares da cavidade bucal. Amostras da saliva (5mL) foram colhidas em coletores estéreis, após salivagem por cada paciente, sem a utilização de agentes estimulantes. Estas foram mantidas e transportadas a 4°C, homogeneizadas e aliqüotadas (1mL) em microtubos, e armazenadas a – 70°C.

5.2.3 - MUCOSA BUCAL

Foi realizado esfregão de toda a mucosa bucal com escova estéril que compõe o kit Digene Cervical Samper, de maneira ordenada seguindo a seqüência das estruturas anatômicas do exame físico intrabucal de partes moles, exceto a orofaringe. Este material foi submerso em 2mL de solução Tris/EDTA (Tris 1M, EDTA 0,5M, pH 8,0), sendo mantido e transportado a 4°C, e aliqüotado 1mL em microtubos para ser conservado a – 70°C.

5.2.4 - BIÓPSIA

Nos casos que houve manifestação clínica de lesões em tecido mole compatíveis com HPV foi realizada biópsia. Os fragmentos do tecido da mucosa bucal foram fixados em formol a 4% tamponado, por 6 a 12 horas. Após emblocagem em parafina, foram feitas secções com 4µm de espessura e coloração por Hematoxilina-Eosina (HE). O diagnóstico histológico foi realizado pelo setor de anatomia patológica do Hospital Santo Antônio.

5.3 DETECÇÃO DE IgA

5.3.1 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

5.3.1.1 - CULTIVO DE CÉLULAS

Os ensaios de imunofluorescência indireta foram realizados no laboratório de virologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia utilizando-se monocamadas confluentes de células epiteliais tumorais denominadas HeLa (Banco de células do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo). A linhagem celular HeLa contém seqüências do HPV-18 e é originária de carcinoma da cérvix uterina humana, decorrente da cepa CCL-2 da ATCC-USA (American Type Culture Collection). Estas células foram mantidas em frascos de 75cm² (NUNC), com meio mínimo essencial de Eagle (GIBCO), suplementado com 10% de soro fetal bovino (GIBCO), e incubadas a uma temperatura de crescimento de 37°C. A técnica de desagregação enzimática para a dispersão do tapete e repique celular foi realizada utilizando tripsina 0,25% de acordo com BLAKE & STACEY (1999).

5.3.1.2 - PREPARAÇÃO DAS LÂMINAS

As células HeLa submetidas a ação da tripsina 0,25% para desagregação e dispersão do tapete celular foram centrifugadas durante 10 minutos a 3.000 rpm, o precipitado celular foi ressuspensão em 500µL de PBS (NaCl 150mM, KH₂PO₄ 1,5mM, Na₂HPO₄ 20mM, KCl 27mM, pH 7,2) e em lâminas com poços demarcados foram semeadas 20µL deste em cada poço (concentração celular aproximadamente 7,6 x 10⁴ células/mL). Permanecendo a 37°C *overnight* para secagem e posteriormente submetidas ao processo de fixação com acetona durante 15 minutos, a -20°C. As mesmas foram armazenadas a -20°C até a sua utilização.

5.3.1.3 - DETECÇÃO DE ANTICORPOS ESPECÍFICOS

As lâminas demarcadas contendo as células HeLa foram incubadas com o fluido salivar diluído em PBS (1:2 e 1:4), *overnight* a 4°C em câmara úmida. Após este intervalo de tempo, foram lavadas três vezes com PBS durante 10 minutos e incubadas com conjugado anti-IgA humana-FITC (GMK Diagnósticos) (1:10), por 1 hora, a 37°C e, em seguida, submetidas a mais 3 lavagens com PBS, 10 minutos cada. A contra-coloração com Azul de Evans (0,01%) por 3 minutos foi realizada para realçar o contraste com a fluorescência específica. As lâminas foram montadas com lamínulas utilizando glicerina 50% (v/v) em solução de PBS, e observadas ao microscópio de fluorescência MC 80 DX (Zeiss).

Em todas as provas foram feitos controles celulares negativo e positivo. Para o controle negativo, utilizou-se saliva de pacientes saudáveis seguindo o mesmo protocolo das amostras do grupo teste. Para o controle positivo, foi utilizado o soro bovino infectado por Papiloma vírus, diluído em PBS (1:5 e 1:10) e incubado com conjugado anti-IgG bovino- FITC (Sigma) (1:200), seguindo a mesma técnica descrita anteriormente.

5.4 DETECCÃO DO DNA VIRAL (PCR)

5.4.1 - TRATAMENTO DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DO DNA VIRAL

Primeiramente as amostras de esfregaços da mucosa bucal foram descongeladas a temperatura ambiente (25°C), e centrifugadas por 15 minutos a 10°C em 8.000 rpm para obtenção das células mucosas. Este precipitado foi ressuspensão em 200µL de PBS estéril e posteriormente submetido à extração do DNA. O DNA viral foi extraído com o QIAamp DNA Mini Kit da Qiagen seguindo o protocolo do fabricante e armazenado a - 20°C até sua utilização.

5.4.2 - REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A PCR foi realizada no laboratório de virologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia com o objetivo de amplificar o DNA-HPV. Foram utilizados os *primers* MY09-MY11 (Invitrogen) (Tabela I), correspondentes à região L1 do genoma viral (BAUER & MANOS, 1993 e KANESHIMA *et al.*, 2001). Estes iniciadores se unem a uma região de 450 pares de bases (pb) do gene L1 altamente conservado nos diferentes tipos de HPV.

As reações de amplificação foram realizadas em um único tubo, em um termociclador Gene Amp OCR System 2400 (Perkin Elmer). O DNA genômico (20µL) foi adicionado à mistura contendo: 4.0mM de MgCl₂, 200µM de cada desoxinucleotídeo trifosfatado (dNTP); 5µL de Tampão 10X; 50pmol de cada *primer* (MY09 e MY11); 2.5U de Taq DNA polimerase e H₂O Mili-Q para um volume final da reação de 50µL. A reação foi realizada nas seguintes condições: o primeiro ciclo da amplificação consistiu de 5' a 95°C e 35 ciclos de 92°C por 40" (Desnaturação), 56°C por 50" (Anelacção) e 72°C por 1' (Extensão). A etapa final de extensão foi de 72°C por 4'.

O controle positivo (células HeLa, originárias de carcinoma da cérvix uterina humana infectadas com HPV-18) e o controle negativo (contendo todos os reagentes exceto DNA) foram adicionados a cada grupo de amostras testadas.

A avaliação da integridade do DNA de cada amostra, foi realizada através da amplificação do gene humano da β -globina, usando os *primers* PC04 e GH20, seguindo o mesmo ciclo de amplificação anteriormente citado (BAUER & MANOS, 1993) (Tabela I).

Tabela I. Desenho dos *primers* utilizados para HPV e β -globina

<i>Primer</i>	<i>Seqüência (5' – 3')^a</i>
MY9 <i>downstream</i> HPV L1	CGTCCMAARGGAWACTGATC
MY11 <i>upstream</i> HPV L1	GCMCAGGGWCATAAYAATGG
PCO4 <i>downstream</i> β -globina	CAACTTCATCCACGTTCCACC
GH20 <i>upstream</i> β -globina	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC

M= A OU C, R= A OU G, W= A OU T, Y= C OU T

BAUER & MANOS, 1993

5.4.3. ANÁLISE DOS PRODUTOS DA PCR POR ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Os produtos das PCRs foram analisados por eletroforese horizontal em gel de Agarose à 2%, corado com Brometo de Etídio (1 μ g/mL) durante 15 minutos, e posteriormente visualizado em transiluminador de luz ultra-violeta (UV) e fotografado. A banda de aproximadamente 450pb corresponde à amplificação do gene L1 do HPV, e a de 265pb é correspondente ao gene da β -globina. A determinação do peso molecular foi realizada utilizando marcadores de peso molecular (100pb DNA *ladder*-GIBCO).

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A caracterização da amostra foi realizada através de uma análise descritiva obtendo-se frequência relativa, média aritmética e desvio padrão. A medida estatística Kappa foi utilizada para avaliar a concordância dos resultados dos métodos PCR e IFI. Para identificar associações existentes entre a presença do DNA viral e da imunoglobulina A na saliva, com as variáveis sócio-demográficas, comportamentais e de saúde, foi empregado o Chi-quadrado para tabelas 2 x 2 e o Teste Exato de Fisher para tabelas L x C, quando mais adequado (MEHTA & PATEL, 1983). A razão de prevalência e seus respectivos intervalos de confiança a 95%, foram utilizados como medida de associação. A probabilidade de erro foi considerada significativa se $p \leq 0,05$ e intervalo de confiança de 95%. A digitação dos dados e a análise estatística foram realizadas no programa SPSS versão 12.0.

5.6 COMITÊ DE ÉTICA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital Santo Antônio, de acordo com a resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (Anexo III).

6 RESULTADOS

6.1 DETECÇÃO DA IMUNOGLOBULINA “A” ANTI-HPV PELO MÉTODO DA IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

A tabela 1 apresenta os resultados da detecção de IgA específica para HPV pelo método da imunofluorescência indireta. Em 44% das amostras da saliva das pacientes estudadas, detectou-se IgA anti-HPV, e observou-se ausência desta imunoglobulina em 56% da amostragem. Forte fluorescência no citoplasma celular foi observada nas amostras positivas, quando diluídas 1:2 (Figura 1.A), e fraca fluorescência quando diluídas 1:4 (Figura 1.B). Entretanto, num pequeno número de amostras (11%), observou-se uma fraca fluorescência em ambas diluições, sendo estas igualmente consideradas positivas. O soro bovino anti-BPV foi utilizado como controle positivo (Figura 1.C). O controle negativo da reação foi estabelecido pela incubação das células com amostra de saliva de paciente saudável diluída em 1:2 (Figura 1.D).

Tabela 1
Imunofluorencência indireta em células HeLa - Detecção de IgA anti-HPV na saliva

	<i>Frequência</i> (%)
IFI positivo (+)	44
IFI negativo (-)	56
Total	100

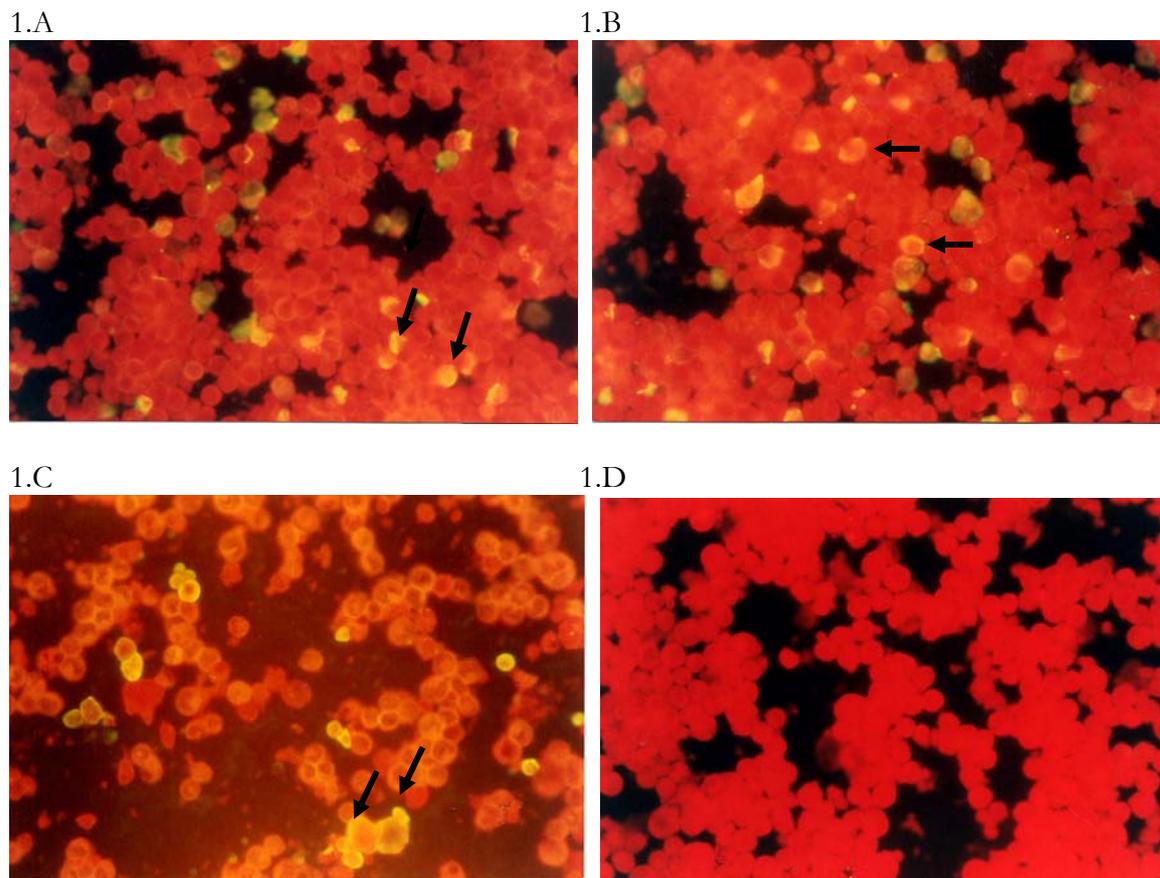


Figura 1. Imunofluorescência indireta em células HeLa infectadas pelo HPV 18.

1.A) Amostra de saliva diluída em 1:2. Fluorescência citoplasmática positiva indica presença de IgA anti-HPV (setas).

1.B) Amostra de saliva diluída em 1:4. Fluorescência citoplasmática positiva indica presença de IgA anti-HPV (setas).

1.C) Amostra de soro bovino diluído em 1:10 (Controle positivo). Fluorescência citoplasmática positiva indica presença de IgG anti-BPV (setas).

1.D) Controle negativo com amostra de saliva paciente saudável diluída em 1:2. Indica ausência de fluorescência citoplasmática.

6.2 DETECÇÃO DO DNA – HPV PELA REACÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos da detecção do DNA-HPV nas amostras de esfregaço bucal, sendo observado que 81% do total das amostras foram positivas e 19% negativas. A figura 2 mostra o padrão das bandas amplificadas cuja positividade foi considerada pela identificação da banda de 450 pares de base (pb), correspondente a amplificação do gene L1 altamente conservado nos diferentes tipos de HPV. A integridade do DNA das amostras estudadas foi comprovada pela amplificação positiva do gene humano da β -globina, cuja banda corresponde a 265pb (Figura 2).

Tabela 2
PCR - Detecção do DNA-HPV em esfregaço da mucosa bucal

	<i>Frequência</i> (%)
PCR positivo (+)	81
PCR negativo (-)	19
Total	100

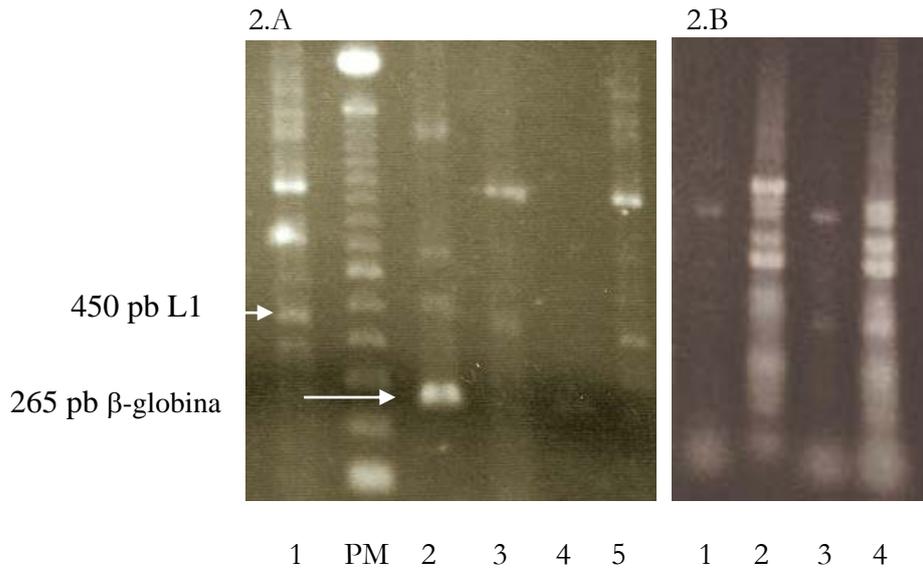


Figura 2. Detecção do DNA viral em amostras de esfregaço da mucosa bucal.
 6.A) Linha 1: Amostra positiva 86; PM: marcador de peso molecular (100pb DNA *ladder* – GIBCO); Linha 2: Controle β -globina Amostra 82; Linha 3: Amostra positiva 82. Linha 4: Controle β -globina Amostra 74; Linha 5: Amostra positiva 74
 6.B) Linha 1: Amostra negativa 17; Linha 2: Controle de células HeLa. Linha 3: Amostra positiva 68; Linha 4: Controle β -globina células HeLa.

6.3 RESULTADOS COMPARATIVOS DA DETECÇÃO DO HPV NAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL (PCR) E IgA ESPECÍFICA NA SALVA (IFI)

A tabela 3 mostra a comparação dos resultados dos métodos PCR para detecção do DNA viral nas células da mucosa bucal e IFI para detecção de IgA específica. Ao analisar comparativamente os resultados, observa-se que 35 amostras (35%) foram positivas para o DNA viral, e para a imunoglobulina A anti-HPV. Apenas 10 amostras (10%) foram negativas para ambos métodos. Entretanto, verifica-se que em 46 amostras (46%) foi possível detectar o DNA viral nas células da mucosa bucal, mas não se observou a presença de IgA específica para o HPV na saliva. Em apenas 9 amostras (9%) detectou-se a imunoglobulina A anti-HPV, na ausência do DNA viral. De acordo com os valores do κ e do p -valor obtidos, não se observou concordância nestes resultados.

Tabela 3
 Comparação dos resultados dos métodos de diagnóstico PCR e IFI

PCR	IFI		Total
	Positivo n (%)	Negativo n (%)	
Positivo n (%)	35	46	81
Negativo n (%)	9	10	19
Total	44	56	100

Kappa (κ): - 0,024
p-valor: 0,742
 IC: - 0,167 a 0,119

6.4 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO QUANTO AOS FATORES SÓCIO-DEMOGRÁFICOS, COMPORTAMENTAIS E DE SAÚDE

A caracterização da população em estudo foi realizada a partir de variáveis classificadas em: demográficas (idade e grupo étnico); sociais (estado civil, instrução e ocupação); comportamentais que expressam o estilo de vida (hábito de fumar, consumo de álcool, frequência de escovação dentária, uso do fio dental, uso de enxaguatórios bucais, início da atividade sexual (coitarca), prática do sexo oral, frequência do sexo oral, uso de preservativos durante as relações sexuais e número de parceiros atuais), e variáveis de saúde referentes a doenças infecciosas já manifestadas pelas mulheres estudadas e seus parceiros (doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) e recidiva do HPV). A distribuição da frequência relativa destas variáveis está apresentada nas tabelas 4, 5, 6 e 7 respectivamente.

A idade da população do estudo variou entre 14 e 59 anos, com uma média de $28,91 \pm 8,7$ anos, a maioria das pacientes (62%) tinha abaixo de 30 anos. A tabela 4 mostra as características sócio-demográficas desta população, sendo que, observou-se predominância do grupo étnico fioderma (64%), estado civil, casada (56%), escolaridade igual ao segundo grau completo (49%),

sendo que pouco mais da metade (56,6%) apresentaram-se como trabalhadoras ativas, prevalecendo às domésticas (25%).

Tabela 4
Características sócio-demográficas da população do estudo

<i>Variáveis</i>	<i>Frequência (%)</i>
Grupo Étnico	
Leucoderma	2,0
Faioderma	64,0
Melanoderma	34,0
Estado Civil	
Solteira	43,0
Casada	56,0
Viúva	1,0
Escolaridade	
Sem escolaridade	2,0
1º grau	47,0
2º grau	49,0
3º grau	2,0
Ocupação*	
Trabalhador ativo	56,6
Trabalhador não ativo	43,4
Profissão	
Doméstica	25,0
Estudante	15,0
Do lar	15,0
Outras	45,0

* Dados referentes a 99 pacientes.

A tabela 5 mostra a distribuição da frequência relativa das variáveis comportamentais, em que se verificou que a maior parte da população estudada (85%) apresentou-se como não fumante e consumidoras de bebidas alcoólicas (67%). Em relação ao comportamento referente aos cuidados com a saúde bucal, observou-se que a maioria das mulheres entrevistadas realiza escovação dentária duas vezes ao dia (47%), não utiliza o fio dental (66,7%), não faz uso de enxaguatórios bucais (81,8%), e apenas uma pequena parte delas (15,2%) utiliza outros recursos de higiene oral, como palito, bochecho com água, linha de costura dentre outros.

Tabela 5
Características comportamentais da população do estudo

<i>Variáveis</i>	<i>Frequência (%)</i>
Tabagismo	
Sim	15,0
Não	85,0
Etilismo	
Sim	67,0
Não	33,0
Frequência de escovação diária	
1 vez	9,0
2 vezes	47,0
3 vezes	44,0
Uso do fio dental diário*	
Sim	33,3
Não	66,7
Uso de enxaguardos bucais*	
Sim	18,2
Não	81,8
Coitarca	
< 16 anos	35,0
16 a 20 anos	46,0
> 20 anos	16,0
Não lembra	3,0
Prática sexo oral	
Sim	64,0
Não	36,0
Frequência de prática de sexo oral*	
Em todas as relações	12,3
Às vezes	44,7
Raramente	43,0
Uso de preservativo*	
Em todas as relações	61,5
Às vezes	28,1
Raramente	10,4
Número de parceiros atuais	
Um	88,0
Mais de um	5,0
Sem parceiro	7,0

* Dados referentes a n< 100.

As variáveis comportamentais da população do estudo, que se referem à prática sexual, foram caracterizadas por um maior número de mulheres que iniciaram a atividade sexual entre 16 e 20 anos (46%), pratica sexo oral em seus parceiros (64%) e nem sempre exerce este tipo de sexo durante as relações (44,7%). Observou-se ainda que a maioria delas (61,5%) utiliza o preservativo em todas as relações sexuais, e relatou monogamia (88%) (Tabela 5).

A tabela 6 apresenta dados referentes às variáveis de saúde. Desta forma, observou-se que a maioria das pacientes entrevistadas não apresentou antecedentes para DSTs (76%), e daquelas que já haviam sido infectadas por algum tipo de doença sexualmente transmissível, relataram o

Papilomavírus como agente causal (85%). Entretanto, prevaleceram as que apresentaram esta infecção pela primeira vez (89,9%) (Tabela 6).

Tabela 6
Características de saúde da população do estudo

<i>Variáveis</i>	<i>Frequência (%)</i>
Apresentou DST no passado	
Não	76,0
Não sabe	2,0
Sim	22,0
HPV	85,0
Sífilis	5,0
Herpes	5,0
Não sabe	5,0
Infecção por HPV*	
1º vez	89,9
recidiva	10,1
Parceiro apresentou DST	
Não	59,0
Não sabe	26,0
Sim	15,0
HPV	13,3
Hepatite B	33,3
Sífilis	13,3
Outras	13,3
Não sabe	26,8

* Dados referentes a 99 pacientes.

Em relação as DSTs do parceiro, verificou-se que a maioria (59%) não apresentou este tipo de infecção até o momento da entrevista. Porém, entre os infectados, observou-se maior prevalência (33,3%) de infecção pelo vírus da hepatite B (Tabela 6).

6.5 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO QUANTO À SAÚDE BUCAL

Ao questionar as mulheres selecionadas para o estudo a respeito das lesões bucais em tecido mole manifestadas anteriormente, observou-se que metade das entrevistadas relatou manifestar algum tipo de lesão, sendo que a afta apresentou-se como o tipo de lesão mais prevalente (42%). Quanto à localização em que estas lesões se manifestaram, o lábio representou o sítio anatômico de maior prevalência (36%). No que diz respeito à etiologia destas lesões, a

maioria das entrevistadas (62%) relatou não conhecer a causa das lesões. Em relação à forma de tratamento destas, parte das mulheres (34%) respondeu que as mesmas apresentaram cura espontânea, e parte (30%) respondeu cura medicamentosa (Tabela 7).

Tabela 7

Características de saúde bucal da população quanto à distribuição das lesões orais em tecido mole manifestadas previamente ao estudo

<i>Variável</i>	<i>Frequência (%)</i>
Lesões manifestadas em tecido mole	
Sim	50,0
Afta	42,0
Herpes	8,0
Candidíase	2,0
Outras	20,0
Não sabe	28,0
Localização	
Lábio	36,0
Língua	16,0
Gengiva	12,0
Mucosa jugal	8,0
Palato duro	4,0
Soalho bucal	2,0
Outros	22,0
Etiologia da doença	
Desconhecida	62,0
Fúngica	8,0
Viral	6,0
Solar	2,0
Estomacal	2,0
Habitual	2,0
Outras	18,0
Forma de tratamento	
Cura espontânea	34,0
Medicamentosa	30,0
Procedimentos caseiros	12,0
Cirúrgica	2,0
Outros	20,0

Ao exame físico intrabucal observou-se que 49 pacientes apresentaram algum tipo de lesão em tecido mole, destas uma percentagem reduzida (2%) correspondeu a lesões papilomatosas que foram submetidas a biópsia (Anexo IV) . A maioria das manifestações bucais foi representada pela mucosa mordiscada (14,2%), seguida de fibroma traumático (12,2%), abscesso dento alveolar com presença de fístula (8,2%), língua geográfica (8,1%), úlcera aftosa (6,1%), úlcera traumática (6,1%) e candidíase (6,1%) (Tabela 8).

Tabela 8

Características de saúde bucal da população quanto à distribuição das lesões orais em tecido mole manifestadas ao exame físico intrabucal (n=49)

<i>Tipo de lesão</i>	<i>Frequência (%)</i>
Mucosa mordiscada	14,2
Fibroma traumático	12,2
Abscesso dento alveolar com presença de fistula	8,2
Língua geográfica	8,1
Úlcera aftosa	6,1
Úlcera traumática	6,1
Candidíase	6,1
Gengivite	4,1
Abscesso gengival	2,0
Papiloma	2,0
Língua sulcada	2,0
Hiperplasia papilar inflamatória	2,0
Hiperplasia fibrosa inflamatória	2,0
Fenda lábio palatina	2,0
Outras	22,9

6.6 ASSOCIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO POR HPV E

PRESENÇA DO DNA VIRAL NAS CÉLULAS DA MUCOSA BUCAL

As variáveis associadas à infecção do HPV oral consideradas como fatores de risco, são representadas pela escolaridade, estado civil, infecções pregressas da paciente e do parceiro, tabagismo, etilismo, frequência de escovação dentária, uso do fio dental, uso de enxagatórios bucais, idade da coitarca, prática do sexo oral, e multiplicidade de parceiros.

Ao avaliar estes prováveis fatores de risco para a infecção pelo HPV com os resultados da PCR, observou-se que a média de idade das pacientes que apresentaram o DNA-HPV nas células da mucosa bucal foi $29,17 \pm 8,96$ anos, e a média de idade das pacientes que não apresentaram o DNA viral foi $27,72 \pm 7,55$ anos (p-valor= 0,634).

A tabela 9 mostra as associações existentes entre os fatores de risco sócio-demográficos e de saúde em relação à infecção pelo HPV oral. Desta forma, observa-se que metade das mulheres que não possui escolaridade apresentou positividade para este vírus. A maioria das que possui 1º grau completo (89,36%), e 2º grau completo (73,47%), manifestou o DNA-HPV em células da

mucosa bucal. Das entrevistadas que apresentaram 3º grau completo, verificou-se que todas possuíam positividade a PCR.

Tabela 9

Razões de prevalência bruta e os respectivos intervalos de confiança a 95% para associações entre fatores de risco sócio-demográficos e de saúde em relação à infecção pelo HPV oral

<i>Variáveis</i>	PCR <i>Positivo %</i>	PCR <i>Negativo %</i>	<i>p -valor</i>	RP	IC
Escolaridade					
Sem escolaridade	50,00	50,00	0,115 ^b	-	-
1º grau	89,36	10,64			
2º grau	73,47	26,53			
3º grau	100,0	00,00			
Estado civil			0,700 ^a	0,963	0,791-1,714
Solteira	79,07	20,93			
Casada	82,14	17,86			
Recidiva HPV			1,000 ^b	1,077	0,837-1,386
Sim	88,89	11,11			
Não	82,50	17,50			
DST do parceiro			1,000 ^b	1,083	0,926-1,267
HPV	100,00	0,000			
Outras	92,31	7,690			

a: Chi-quadrado

b: teste exato de Fisher

RP: Razão de prevalência

IC: intervalo de confiança

Quanto ao estado civil, observou-se que tanto as mulheres solteiras (79,07%) como também casadas (82,14%), apresentaram o DNA viral nas células da mucosa bucal (RP=0,963 95%IC: 0,791-1,714). Em relação à infecção pregressa pelo papilomavírus, observou-se que a maioria das mulheres que já manifestou esta infecção (88,89%) mostra nas células da mucosa bucal a presença do DNA-HPV, assim como aquelas que manifestaram esta infecção pela primeira vez (82,50%), grande parte apresenta positividade a PCR, observando-se medida de associação: RP=1,077 (95%IC: 0,837-1,386) (Tabela 9).

Em relação ao tipo de DST já apresentada pelo parceiro, observou-se que dos parceiros que já tiveram infecção pelo HPV, o total das mulheres mostrou positividade a PCR. Quanto aos parceiros que já manifestaram outras doenças sexualmente transmissíveis, verificou-se uma alta

prevalência de mulheres (92,31%) PCR positivas, observando-se associação positiva desta variável para a presença do DNA viral nas células da mucosa bucal (RP=1,083 95%IC: 0,926-1,267) (Tabela 9).

A tabela 10 apresenta as associações das variáveis comportamentais em relação à presença do DNA viral nas células da mucosa bucal. Sendo assim, pode-se observar que a maioria das mulheres que fumam (86,67%) apresentou resultado positivo. Um grande número das não-fumantes (80%) também apresentou positividade ao vírus. Apesar de não haver uma associação estatisticamente significativa, a medida de associação (RP) é >1 (RP=1,083 95%IC: 0,865-1,357), sugerindo que para as amostras estudadas o tabagismo pode ser fator de risco ao desenvolvimento da infecção pelo HPV. Quanto ao consumo de bebidas alcoólicas, verificou-se que este fator foi significativo e positivamente associado à presença do DNA viral nas células da mucosa bucal (RP=1,321 95%IC: 1,021-1,708). Sendo assim, grande parte das mulheres etilistas (88,06%) apresentou positividade ao vírus.

Os hábitos de higiene oral também foram avaliados, e em relação à frequência da escovação dentária, observam-se maiores valores de positividade a PCR entre as mulheres que realizam este método de controle mecânico do biofilme dental duas vezes ao dia (89,36%). Grande parte das pacientes que não utiliza o fio dental (83,33%) apresentou positividade a PCR (RP=1,100 95%IC: 0,882-1,372), assim como a maioria daquelas que não utiliza enxaguatórios bucais (83,95%) também mostrou alta prevalência do DNA viral nas células da mucosa bucal (RP=1,259 95%IC: 0,896-1,770). Ambos fatores de risco não apresentaram significância estatística (Tabela 10).

Tabela 10

Razões de prevalência bruta e os respectivos intervalos de confiança a 95% para associações entre fatores de risco comportamentais em relação à infecção pelo HPV oral

<i>Variáveis</i>	<i>PCR Positivo %</i>	<i>PCR Negativo %</i>	<i>p-valor</i>	<i>RP</i>	<i>IC</i>
Tabagismo			0,729 ^b	1,083	0,865-1,357
Sim	86,67	13,33			
Não	80,00	20,00			
Etilismo			0,010 ^{a*}	1,321	1,021 – 1,708
Sim	88,06	11,94			
Não	66,70	33,33			
Frequência de escovação diária			0,113 ^a	-	-
1 vez	66,67	33,33			
2 vezes	89,36	10,64			
3 vezes	75,00	25,00			
Uso do fio dental			0,367 ^a	1,100	0,882 – 1,372
Sim	75,76	24,24			
Não	83,33	16,67			
Uso de enxaguatórios Bucais			0,106 ^b	1,259	0,896 - 1,770
Sim	66,67	33,33			
Não	83,95	16,05			
Coitarca			0,194 ^b	-	-
< 16 anos	85,71	14,29			
16 a 20 anos	80,43	19,57			
> 20 anos	75,00	25,00			
Não lembra	66,67	33,33			
Sexo oral			0,655 ^a	0,956	0,790 – 1,158
Sim	79,69	20,31			
Não	83,33	16,67			
Nº de parceiros atuais			1,000 ^b	-	-
Um	80,68	19,32			
Mais de um	80,00	20,00			
Sem parceiro	85,71	14,29			

a: Chi-quadrado

b: teste exato de Fisher

RP: Razão de prevalência

IC: intervalo de confiança

* estatisticamente significante

Ao analisar a coitarca, verifica-se uma maior frequência de mulheres entre 16 e 20 anos (46%) (Tabela 5), e este grupo mais prevalente apresentou uma alta positividade da PCR (80,43%). Porém observaram-se maiores valores para a presença do DNA-HPV nas mulheres com menos de 16 anos (85,71%). A prática do sexo oral não foi fator positivamente associado à presença do DNA viral (RP=0,950 95%IC: 0,790-1,158), observando-se que uma grande parte das mulheres que não praticam sexo oral (83,33%) apresentou positividade a PCR. Quanto ao número de parceiros sexuais, os valores encontrados para a positividade ao DNA viral foram bem próximos entre as mulheres que relataram possuir apenas um parceiro (80,68%), mais de um (80%) e aquelas que não possuíam parceiro sexual na época da entrevista (85,71%) (Tabela 10).

6.7 ASSOCIAÇÃO DOS FATORES DE RISCO PARA INFECÇÃO POR HPV E PRESENÇA DA IMUNOGLOBULINA “A” ESPECÍFICA NA SALIVA

A média de idade das pacientes com presença e ausência da imunoglobulina A anti-HPV na saliva foi $28,23 \pm 7,91$ anos, e $29,43 \pm 9,30$ anos (p -valor=0,706) respectivamente. A análise dos fatores de risco de saúde associados à positividade para IgA específica contra o HPV na saliva das amostras estudadas, mostra que mais da metade das mulheres estudadas que apresentaram recidiva do HPV (66,67%), possui IgA específica para este vírus na saliva, no entanto, uma pequena quantidade das que manifestaram esta infecção pela primeira vez (38,75%), possuem positividade para esta imunoglobulina. A medida de associação foi $RP=1,720$ (95%IC: 1,005-2,946) (Tabela 11).

Tabela 11
Razões de prevalência bruta e os respectivos intervalos de confiança a 95% para associações entre fatores de risco de saúde em relação a presença de IgA anti-HPV

<i>Variáveis</i>	<i>IFI Positivo %</i>	<i>IFI Negativo %</i>	<i>p -valor</i>	<i>RP</i>	<i>IC</i>
Recidiva HPV			0,155 ^b	1,720	1,005-2,946
Sim	66,67	33,33			
Primeira vez	38,75	61,25			
DST do parceiro			1,000 ^b	0,650	0,104-4,058
HPV	25,00	75,00			
Outras	38,46	61,54			

a: Chi-quadrado

b: teste exato de Fisher

RP: Razão de prevalência

IC: intervalo de confiança

Quanto ao tipo de DST já apresentada pelo parceiro, observou-se que dos parceiros que já manifestaram o HPV, apenas um quarto das mulheres (25%) foi verificada positividade a IFI. Dos parceiros que já manifestaram outras doenças sexualmente transmissíveis, em menos da metade delas (38,46%) identificou-se a presença de IgA anti-HPV na saliva. Nesta análise, não foi

observada associação positiva para a presença de IgA específica neste fluido (RP=0,650 95%IC: 0,104-4,058) (Tabela 11).

A tabela 12 mostra associações entre fatores de risco comportamentais em relação à presença de IgA anti-HPV na saliva, e desta forma, pode-se observar que pouco mais da metade das mulheres que fumam (53,33%), possui a IgA específica para o HPV, e pouco menos da metade das que não fumam (42,35%) apresentou positividade para a presença de IgA na saliva. Nota-se que não houve uma associação estatisticamente significativa, mas a medida de associação RP é >1 (RP=1,259 95%IC:0,738-2,149).

Tabela 12

Razões de prevalência bruta e os respectivos intervalos de confiança a 95% para associações entre fatores de risco comportamentais em relação a presença de IgA anti-HPV

<i>Variáveis</i>	<i>IFI Positivo %</i>	<i>IFI Negativo %</i>	<i>p-valor</i>	<i>RP</i>	<i>IC</i>
Tabagismo			0,430 ^a	1,259	0,738 – 2,149
Sim	53,33	46,67			
Não	42,35	57,65			
Etilismo			0,053 ^a	1,675	0,948 – 2,958
Sim	50,75	49,25			
Não	30,30	69,70			
Frequência de escovação diária			0,508 ^a	-	-
1 vez	55,56	44,44			
2 vezes	38,30	61,70			
3 vezes	47,73	52,27			
Uso do fio dental			0,567 ^a	0,875	0,558 – 1,372
Sim	48,48	51,52			
Não	42,42	57,58			
Uso de enxaguatórios Bucais			0,667 ^a	1,143	0,610 – 2,142
Sim	38,89	61,11			
Não	44,44	55,56			
Coitarca			0,194 ^b	-	-
< 16 anos	54,29	45,71			
16 a 20 anos	41,30	58,70			
> 20 anos	25,00	75,00			
Não lembra	66,67	33,33			
Sexo oral			0,107 ^a	1,500	0,889 – 2,530
Sim	50,00	50,00			
Não	33,33	66,67			
Nº de parceiros atuais			0,894 ^b	-	-
Um	43,18	56,82			
Mais de um	60,00	40,00			
Sem parceiro	42,86	57,14			

a: Chi-quadrado

b: teste exato de Fisher

RP: Razão de prevalência

IC: intervalo de confiança

* estatisticamente significante

Quanto ao consumo de bebidas alcoólicas, observam-se níveis *boderline* de significância estatística e positividade para associação desta variável com a presença da imunoglobulina A na saliva das pacientes estudadas (RP=1,675 95%IC 0,948-2,958) (Tabela 12).

Em relação à frequência de escovação dentária, verifica-se que enquanto para a PCR, as mulheres que realizam este método de higiene oral duas vezes ao dia, apresentam maiores valores para a presença de DNA-HPV nas células da mucosa bucal, este grupo apresenta valores menos prevalentes (38,30%), quanto à presença de IgA específica. A utilização do fio dental não se apresentou como fator positivamente associado para a presença da imunoglobulina A na saliva (RP=0,875 95%IC 0,558-1,372). Já o fator, uso de enxaguatórios bucais mostrou uma associação positiva para a presença de IgA anti-HPV (RP=1,143 95%IC 0,610-2,142). Os maiores valores para a IFI, quanto à faixa etária em que se iniciou a atividade sexual (coitarca), foi verificado entre as mulheres que não se recordam do período (66,67%) em que iniciaram esta prática (Tabela 12).

O sexo oral apresentou-se como fator positivamente associado para a presença de IgA específica na saliva (RP=1,500 95%IC 0,889-2,530), e metade das mulheres que praticam sexo oral, apresentam esta imunoglobulina na saliva. Quanto ao número de parceiros sexuais, observou-se maior prevalência de IgA para aquelas que relataram poligamia (60%) (Tabela 12).

7 DISCUSSÃO

O Papilomavírus humano é um patógeno capaz de infectar tecido epitelial de revestimento externo e mucoso. Sabe-se que a infecção por HPV na boca está associada a fatores de risco como, o uso do álcool, fumo, prática do sexo oral, dentre outros, e a co-fatores que atuam favorecendo ou dificultando a patogenicidade do vírus, destacando-se a resposta imune humoral, que desempenha papel importante na homeostase bucal.

Sugere-se que pacientes com infecção cérvico-vaginal por HPV estão predispostas a infecção da mucosa bucal devido à possibilidade da autotransmissão (KAMEYAMA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004). Neste estudo, foi demonstrada uma alta prevalência do DNA viral nas células da mucosa bucal de pacientes infectadas por HPV cérvico-vaginal, concomitante a uma ausência de manifestação clínica de infecção na boca. Apesar de não estar bem estabelecida a via de transmissão do HPV oral, a possibilidade da autotransmissão não deve ser descartada. As próprias pacientes infectadas poderiam ser responsáveis por disseminarem o vírus de uma região do corpo, por exemplo, da genitália, para outra (KAMEYAMA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2003; CASTRO *et al.*, 2004). Este fato poderia estar associado a ocorrência de recidivas de lesões clínicas na mucosa cervical, o que permitiria a presença ativa do vírus no organismo, aumentando as possibilidades de infecção de outros tecidos, como a mucosa bucal onde traumas e lesões patológicas representariam possíveis portas de entrada para a instalação do processo infeccioso viral (FRANCO, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 2003; ROSENBLATT *et al.*, 2005). Nesta população estudada a presença de recidiva da lesão cervical foi observada, mas a maioria das pacientes informaram não apresentar lesões recidivantes.

Sabe-se também, que além de fatores predisponentes como lesões e traumas em tecidos moles da boca, existe uma associação direta de fatores de risco para o HPV, tais como estado civil, idade em que se iniciou a atividade sexual, práticas do sexo oral, uso do fumo, álcool,

enxaguatórios bucais e outros, que contribuem para alterar a integridade da mucosa bucal e eficiência do seu mecanismo de defesa imunológico. Segundo o presente estudo, quanto mais cedo a coitarca, maior a prevalência de infecção pelo HPV oral, fator este concordante com os relatos da literatura (BREITENBACH *et al.*, 2002; PINTO *et al.*, 2002; CASTRO *et al.*, 2004). Quanto à prática do sexo oral, observa-se uma prevalência considerável de mulheres que o praticam e possuem o DNA viral em suas células da mucosa bucal. Apesar deste fator não apresentar associação positiva para a infecção pelo HPV oral nesta amostra, estes resultados são concordantes com os relatos de Syrjänen e colaboradores (2006). Nestes casos, porém, o que se observa é que o parceiro infectado e manifestando lesões clínicas poderia representar uma via de contágio importante para a infecção. Mais da metade das mulheres estudadas são casadas, e estas apresentaram maior positividade para DNA-HPV em relação às demais, o que concorda com os estudos de Dores e colaboradores (1991). No entanto, Sellors e colaboradores (2000) demonstraram que pacientes casadas apresentaram menor porcentagem de infecção que mulheres de outros estados civis. Desta forma, observa-se que assim como em outros aspectos, esta questão também manifesta achados e opiniões adversas. Porém, uma provável justificativa para esta classe de mulheres apresentar maior prevalência para o HPV, é representada pelo fato das mulheres casadas possuírem uma vida sexual mais estável, com menor troca de parceiros, não se preocupando assim, em utilizar métodos de barreiras. Além disso, ainda existe a possibilidade da promiscuidade do parceiro, que concorre para esta elevada prevalência (DÓRES *et al.*, 1991; BREITENBACH *et al.*, 2002).

O tabagismo também é apontado como um fator de risco para a infecção pelo HPV bucal. Vários autores mostram uma associação importante entre o uso do cigarro e a persistência da infecção por HPV de alto risco oncogénico, e conseqüentemente, com a prevalência de lesões e recidivas. Parece que além de poder facilitar a ação viral por meio de reações químicas entre seus metabólitos e o DNA do hospedeiro, o uso do fumo apresenta, principalmente, efeito inibitório sobre a resposta imune celular, possibilitando a persistência da ação viral com suas

conseqüências (BURK *et al.*, 1996). Neste estudo, observou-se que o tabagismo parece ser um fator de risco para o HPV oral, porém não houve significância estatística. Mas quanto ao etilismo, além da associação positiva entre manifestar o vírus nas células da mucosa bucal e ingerir bebidas alcoólicas, os resultados foram estatisticamente significantes confirmando os dados da literatura, que indivíduos etilistas apresentam maior probabilidade de serem infectados pelo Papilomavírus humano.

A ausência clínica de lesão em tecido mucoso em associação com a presença do DNA viral nas células da mucosa bucal sugere uma forma subclínica da infecção. Não existe um teste simples e prático para detectar a infecção subclínica pelo HPV, como também não se sabe se a contagiosidade dessa forma de infecção é igual à das lesões exofíticas. É sabido que a presença de HPV em mucosa normal apresenta dados bastante conflitantes em razão da variedade de métodos e dos grupos de pacientes pesquisados, sendo a PCR a técnica mais utilizada para a detecção do DNA-HPV na cavidade bucal (TERAI & BURK, 2001). Em um estudo realizado por Terai e colaboradores (1999) usando a PCR, observaram alta prevalência (56,7%) de HPV na mucosa bucal normal de adultos de ambos os sexos. Estes dados concordam com os resultados do nosso estudo.

Uma vez estabelecida a infecção viral, os mecanismos exatos que acionam uma resposta imune eficiente contra lesões relacionadas ao HPV, ainda não são conhecidos. Eles podem estar relacionados à ativação do sistema imunológico ou à composição genética do hospedeiro. Uma vez que a exposição direta das proteínas do HPV a células imunocompetentes não ocorre, é concebível que o desenvolvimento de anticorpos às proteínas virais, pode depender de uma infecção secundária por meio de pequenas abrasões ou soluções de continuidade do epitélio, resultando na exposição das proteínas virais a estas células (PINTO *et al.*, 2002).

Está bem estabelecido que a SIgA é a imunoglobulina predominante da saliva e é considerada o principal mecanismo de defesa específico da cavidade oral (LAVOIE & MARCOTTE, 1998). Representa um efector primário da imunidade das mucosas e desempenha

papel preponderante sobre as atividades das demais imunoglobulinas (LAVOIE & MARCOTTE, 1998; GIRALDO *et al.*, 2006b). Indivíduos com baixos níveis de IgA secretória são mais susceptíveis a desenvolverem infecção por HPV na mucosa oral e genital (GIRALDO *et al.*, 2006b). No presente estudo a análise da resposta imune humoral ao determinar a presença da imunoglobulina A específica contra o HPV, mostrou que mais da metade das amostras (56%) foram negativas. Esta ausência de IgA específica em presença do vírus na célula da mucosa bucal, levaria a considerar três possíveis eventos relacionados aos mecanismos de resposta imune frente ao HPV: a) diminuição das APCs e linfócitos T devido a infecção pelo Papilomavírus, b) atraso do reconhecimento imune ao vírus, c) tempo de oroconversão.

De acordo com Gonçalves e Donadi (2004) a infecção viral pode causar uma diminuição das APCs e linfócitos T, refletindo em uma baixa produção ou ausência de anticorpos específicos. Como a produção de anticorpos depende da ativação clonal dos linfócitos B pelos linfócitos T, e a ativação destes últimos depende do primeiro sinal, que é a presença do antígeno reconhecido e apresentado pelas APCs, a resposta imune humoral torna-se conseqüentemente comprometida. Uma outra hipótese proposta por Stanley (1999) poderia justificar a baixa frequência de IgA anti-HPV encontrada neste estudo, que é representada pelo atraso do reconhecimento do sistema imunológico ao vírus, devido ao fato do HPV não causar lise celular, permanecendo isolado das células responsáveis pelo reconhecimento imunológico do hospedeiro. Por último o tempo de oroconversão, também deve ser considerado, na medida em que, não se sabe quanto tempo é necessário para ocorrer a produção de imunoglobulina A específica na saliva anti-HPV, após o contato dos componentes do sistema imune com o referido vírus. Este aspecto pode levantar a hipótese de que a oroconversão não tenha ocorrido até o momento da coleta das amostras. Fato este, que pode ser justificado ao analisar a associação entre presença de IgA anti-HPV na saliva, com o fator recidiva da infecção por HPV. Os resultados deste estudo mostram que mais da metade das mulheres que manifestaram a infecção no colo uterino outras vezes, apresentaram IgA anti-HPV, enquanto que poucas mulheres que manifestaram esta

infecção pela primeira vez apresentaram positividade para esta imunoglobulina. Estes dados, apesar de não apresentarem significância estatística, possuem uma Razão de prevalência de 1,720, indicando, portanto, que a recidiva de lesões cérvico-vaginal pode representar um fator que predispõe a produção de anticorpos específicos para o HPV na saliva. Sendo assim, estes achados sugerem que o tempo de oroconversão exerce papel fundamental na defesa imune e pode explicar o fato observado no grupo 2, em que se verifica a presença de DNA viral nas células da mucosa bucal e ausência de IgA específica.

Estudos longitudinais que caracterizam a história natural da resposta imune contra o HPV têm sido desenvolvidos, no entanto o tempo entre a aquisição da infecção por este vírus e o desenvolvimento de IgA específico e a duração da manutenção desta resposta é ainda indefinida (GALLOWAY *et al.*, 2003).

Interessantemente, no grupo 3, observa-se a presença da IgA anti-HPV na saliva, e ausência do DNA viral nas células da mucosa bucal. O teste utilizado para a detecção deste DNA, apresenta alta sensibilidade, e os iniciadores selecionados para o estudo, MY09/11, são eficientes na detecção do DNA viral, uma vez que amplificam muitos tipos do HPV (KIRNBAUER *et al.*, 1994). Sendo assim, de acordo com a literatura, sugere-se que a imunoglobulina A anti-HPV encontrada nestas amostras, pode ser originária de células B precursoras de IgA, sensibilizadas no tecido linfóide associado a mucosa cervical (LAVOIE & MARCOTTE, 1998). O clone de célula B sensibilizado migra para os órgãos linfóides bucais onde sofre expansão clonal e produção de IgA anti-HPV. Além disso, a própria IgA também poderia ser transportada pelo MALT.

Ao observar os fatores de risco para a infecção pelo HPV oral e a presença da imunoglobulina A específica, verifica-se nesta população maior prevalência da IgA no grupo de mulheres que iniciaram a coitarca com menor idade. Este fato pode está associado ao tempo de oroconversão. Observa-se também uma prevalência considerável de mulheres que praticam sexo oral em seus parceiros, e metade destas apresentaram IgA anti-HPV na saliva, havendo uma forte

associação entre praticar o sexo oral e produzir IgA específica contra este vírus. O contato direto da cavidade oral com lesões genitais do parceiro, pode ter favorecido para a ativação de uma resposta imune humoral.

Um outro fator de risco para o HPV oral, o tabagismo, diminui significativamente a quantidade e função das células de Langerhans, células apresentadoras de antígeno que desempenham papel fundamental na ativação da imunidade celular contra o HPV (ROSENBLATT *et al.*, 2005). De acordo com Sellors e colaboradores (2000) o fumo é fator de risco para o desenvolvimento da infecção e, sendo assim, observa-se que fatores físicos e fatores do hospedeiro podem afetar a concentração de imunoglobulinas. Granade e colaboradores (2002), relataram que o sexo, a idade e fatores externos como o fumo e o hábito de mascar tabaco, podem interferir na concentração de IgG do fluido oral e estes variam consideravelmente entre os estudos. De acordo com estes autores, ao avaliar a influencia de fatores do hospedeiro na concentração da imunoglobulina G em amostras do fluido oral, verificaram que o fumo foi reportado por 29,7% dos participantes, e apenas 0,5% mascavam o tabaco. Dos indivíduos estudados, 6,0% utilizavam enxaguatórios bucais, não havendo diferenças significantes para estas variáveis. O uso do cigarro e de enxaguatórios bucais foram associados a um pequeno decréscimo da concentração de IgG, mas somente o tabagismo foi significativo. Porém, neste estudo, o que se pode observar é que mulheres fumantes e consumidoras de bebidas alcoólicas apresentaram maior prevalência da IgA anti-HPV na saliva. Estes dados indicam que o fumo e o álcool, para esta amostra, pode representar um fator de proteção discordando com os dados da literatura (BREITENBACH *et al.*, 2002). Sendo assim, novos estudos com uma amostragem maior seriam necessários para uma maior investigação destes dados.

Ao analisar as variáveis relacionadas à higiene bucal, observa-se que as mulheres que utilizam enxaguatórios bucais apresentaram menor positividade para a presença de imunoglobulinas A anti-HPV na saliva, sugerindo que o uso destes pode diminuir a concentração de imunoglobulinas neste fluido. Estes achados foram obtidos de uma população de baixa renda,

fator que deve ser considerado ao avaliar os fatores de risco para a infecção pelo Papilomavírus humano na cavidade bucal.

Observa-se na literatura escassez de informações sobre a epidemiologia, resposta imunológica e fatores de risco associados à infecção por HPV bucal. Desta forma estudos futuros sobre o tema contribuiriam para esclarecer a via de infecção e patogenia do vírus, bem como a prevalência de lesões bucais papilomatosas em nossa população.

8 CONCLUSÕES

1. Foi demonstrada uma alta prevalência (81%) do DNA viral na mucosa bucal em pacientes infectadas pelo HPV na região cérvico-vaginal;
2. A presença do DNA viral na mucosa bucal não estava associada à lesão clínica evidente;
3. A presença do DNA viral na mucosa bucal foi independente da presença de IgA anti-HPV na saliva na maioria das pacientes;
4. Ficam caracterizados como prováveis fatores de risco para o HPV oral, nesta população: mulheres casadas, com início precoce da atividade sexual, que praticam sexo oral, etilistas, tabagista, que utilizam enxaguatórios bucais e que apresentaram recidiva de lesões papilomatosas na região cérvico-vaginal.

9 REFERÊNCIAS

1. ARSTRONG, S. J.; DIMMOCK, N. J. Neutralization of influenza virus by low concentrations of hemagglutinin-specific polymeric immunoglobulin A inhibits viral fusion activity, but activation of the ribonucleoprotein is also inhibited. **Journal of Virology**, v. 66, n. 6, p.3823-32, June. 1992.
2. BAGG, J.; PERRY, K. R.; PARRY, J. V.; MORTIMER, P. P.; PETERS, T. J. The influence of dental status on the detection of IgG class anti-viral antibodies in human saliva. **Archives of Oral Biology**, v. 36, n. 3, p. 221-26, 1991.
3. BAUER, H.M.; MANOS, M.M. PCR detection of genital Human Papillomavirus. In: PERSING, D.H.; SMITH, T.F.; TENOVE, F.C.; WHITE, T.J. **Diagnostic Molecular Microbiology Principles and Applications**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1993. p.407-13.
4. BERNARD, H.; VILLIERS, E. De; FAUQUET, C.; BROKER, T. R.; HAUSEN, H. Z. Classification of papillomavirus. **Virology**, v. 324, Issue 1, p.17-27, June. 2004.
5. BLAKE, K; STACEY, A. Cell Culture. In: CANN, A. J. **Virus Culture – A Practical Approach**. Ney York: Oxford University Press, 1999. cap.1, p.1-32.
6. BORGES, S. C. V.; MELO de, V. H.; MORTOZA JÚNIOR, G.; ABRANCHES, A.; LIRA NETO, J. B.; TRIGUEIRO, M. C. Taxa de detecção do Papillomavírus humano pela captura híbrida II, em mulheres com neoplasia intra-epitelial cervical. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 26, n.2, p. 105-110, 2004.
7. BOUDA, M.; GORGOULIS, V. G.; KASTRINAKIS, N. G.; GIANNOUDIS, A.; TSOLI, E.; DANASSI-AFENTAKI D. Hight risk HPV types are frequently detected in potentially malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa. **Modern Pathology**, v. 13, n. 6, p.644-53, 2000.
8. BREITENBACH, V.; NONNENMACHER, B.; VILLA, L.L.; PROLLA, J.C.; BOZZETTI, M.C. Identificação do papilomavírus humano por biologia molecular em mulheres assintomáticas. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, n. 1, p. 95-100, fev. 2002.
9. BURK, R. D.; KELLY, P.; FELDMAN, J.; BROMBERG, J.; VERMUND, S. H.; DEHOVITZ, J. A. Declining prevavalence of cervicovaginal human papillomavirus infections with age is independent of other risk factors. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 23, n. 4, p.333-41, Jul/Aug. 1996.
10. CANN, A.J. Human papillomavirus (HPV). In: _____. **Principles of Molecular Virology**. 2 ed. Califórnia: Academy Press San Diego, 1997.
11. CASTRO, T. M. P. G.; NETO, C. E. R.; SCALA, K. A.; SCALA, W. A. Manifestações orais associada ao papilomavírus humano (HPV) conceitos atuais. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, n. 4, p. 546-50, jul/ago. 2004.

12. CARTER, J. J.; KOUTSKY, L. A.; WIPF, G. C.; CHRISTENSEN, N. D.; LEE, S. K.; KUYPERS, J.; KIAVIAT, N.; GALLOWAY, D. A. The natural history of human papillomavirus type 16 capsid antibodies among a cohort of university women. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 174, n. 5, p.927-36, Nov. 1996.
13. CLERICI, M.; MEROLA, M.; FERRARIO, E.; TRABATTONI, D.; VILLA, M.L.; STEFANON, B.; VENZON, D.J.; SHEARER, G.M.; DE PAOLO, G.; CLERICI, E. Cytokine production patterns in cervical intraepithelial neoplasia: associations with papillomavirus infection. **Journal of The National Cancer Institute**, v. 89, n. 3, p.245-50, Feb. 1997.
14. CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE. Pesquisa envolvendo seres humanos. Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996. **Lex: Coletânea de Legislação e Jurisprudência**, São Paulo, p. 2776-2788, set./out., 3. Trim. de 1996. Legislação Federal e Marginalia.
15. DILLNER, L.; BEKASSY, Z.; JONSSON, N.; MORENO-LOPEZ, J.; BLOMBERG, J. Detection of IgA antibodies against human papillomavirus in cervical secretions from patients with cervical intraepithelial neoplasia. **International Journal of Cancer**, v. 43, n. 1, p.36-40, Jan. 1989.
16. DOORBAR, J. The papillomavirus life cycle. **Journal of Clinical Virology**, March 2005; 32 (Supplement 1): p.7-15.
17. DÔRES, G. B.; RIBAL, J. C.; MARTINS, N. V.; FOCCHI, J.; NOVO, N. F.; KOSMISKAS, J. B. Aspectos epidemiológicos da infecção cérvico-vaginal pelo papilomavírus humano. **Jornal Brasileiro de Ginecologia**, v. 101, n. 9, p.369-375, 1991.
18. DÔRES, G. B.; TAROMARU, E. K.; BONOMI, C. G.; LONGATTO FILHO, A.; GILLI, N. P.; MATSUBARA, S.; FOCCHI, J. Determinação da infecção do Papilloamvírus humano por captura híbrida II: Correlações com achados morfológicos. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmete Transmissíveis**, v. 17, n.4, p.255-258, 2005.
19. FERENCZY, A.; BERGERON, C.; RICHART, R. M. Human papilomavirus DNA in fomites on objects used for the management of patients with genital papillomavirus infections. **Obstetrics and Gynecology**, v. 74, n. 6, p.950-54, Dec. 1989.
20. FRANCO, E. L. Understanding the epidemiology of genital infection with oncogenic and nononcogenic human papillomaviruses: a promising lead for primary prevention of cervical cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers**, v. 6, n. 10, p.759-61, Oct. 1997.
21. GALLOWAY, A. D.; ONDA, T.; CARTER, J. J.; KOUTSKY, L. A.; HUGHES, J. P.; LEE, S.; KUYPERS, J.; KIVIAT, N. Characterization of IgA response among women with incident HPV 16 infection. **Virology**, v. 312, n. 1, p.213-221, Jul. 2003.
22. GHIM, S.; NEWSOME, J.; BELL, J.; SUNDBERG, J. P.; SCHELEGEL, R.; JENSON, A.B. Spontaneously regressing oral papilomas indyce systemic antibodies that neutralize canine oral papillomavirus. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 68, n. 3, p.147-51, June. 2000.

23. GIRALDO, P. C.; SIMÕES, J. A.; RIBEIRO-FILHO, A. D.; TAMBASCIA, J.K. Avaliação citológica da orofaringe de mulheres portadoras de HPV genital. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 18, n. 9, p.737-42, Out. 1996.
24. GIRALDO, P.; GONÇALVES, A. K. S.; PEREIRA, S. A. S.; BARROS-MAZON, S.; GONDO, M. L.; WITKIN, S. S. Human papillomavirus in the oral mucosa of women with genital human papillomavirus lesios. **European Journal of Obstetrics & Gynecology Reproductive Biology**, v. 126, n. 1, p.104-106, May 2006a.
25. GIRALDO, P.; GONÇALVES, A. K. S.; BARROS-MAZON. S.; GONDO, M. L.; AMARAL, R. L.; JACYNTHO, C. Secretory immunoglobulin A in saliva of women with oral and genital HPV infection. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 124, n. 2, p.227-31, Feb. 2006b.
26. GONÇALVES, M. A. G.; DONADI, E. A. Imune Cellular Response to HPV: currents Concepts. **The Brazilian of Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p.1-9, 2004.
27. GRANADE, T. C.; PHILLIPS, S.K.; KITSON-PIGGOTT, W.; GOMEZ, P.; MAHABIR, B.; OLEANDER, H.; GEORGE, J.R.; BAGGS, J.; PAREKH, B. Influence of host factors on immunoglobulin G concentration in oral fluid specimens. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 1, p.194-97, Jan. 2002.
28. GRUNDBACHER, F. J. Variation in levels of immunoglobulins A, G and E in human saliva. **Archives of Oral Biology**, v. 33, n. 2, p.121-26, 1988.
29. GUZMÁN, M. G.; BALMASEDA, A.; HAMMOND, S.; ROBLETO, G.; FLORES, C.; TÉLLEZ, Y.; VIDEA, E.; SABORIO, S.; PÉREZ, L.; SANDOVAL, E.; RODRIGUEZ, Y.; HARRIS, E. Diagnosis of Dengue virus infection by detection of specific immunoglobulin M (IgM) and IgA antibodies in serum and saliva. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 2, p. 317-22, Mar. 2003.
30. HAGENSEE, M.E; CAMERON, J. E.; SNOWHITE, I.V.; CHATURVEDI, A.K. Human Papillomavirus-specific antibody status in oral fluids modestly reflects serum status in Human Immunodeficiency Virus-positive individuals. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 3, p.431-38, May. 2003.
31. HAGENSEE, M.E.; KOUTSKY, L.A.; LEE, S.; GRUBERT, T.; KUYPERS, J.; KIVIAT, N.B.; GALLOWAY, A. Detection of cervical antibodies to human papillomavirus type 16 (HPV-16) capsid antigens in relation to detection of HPV-16 DNA and cervical lesions. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 181, n. 4, p.1234-39, Apr. 2000.
32. HOWLEY, P.M. Papillomavirinae and their replication. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Virology**. 2nd. Ney York: Raven Press LTDA, 1990. cap.58.
33. HOWLEY, P.M.; LOWY, D.R. Papillomaviruses and Their Replication. In: KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields Virology**. 4th. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. cap. 65, p.2197-2229.

34. JACYNTHO, C.; SOUZA, M. C. B.; FONSECA, N. M.; CANELLA, P. Nota prévia: a importância do teste de azul de Toluidina no diagnóstico das lesões genitais pelo papilomavírus humano (HPV). **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 9, n. 8, p.151, 1987.
35. JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**. O sistema imune na saúde e na doença. In: _____. 5 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002a. cap.1, p.29-31.
36. JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**. O sistema imune na saúde e na doença. In: _____. 5 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002b. cap.4, p.29-31.
37. JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia**. O sistema imune na saúde e na doença. In: _____. 5 ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002c. cap. 9, p386-88.
38. JENSON, A. B.; KURMAN, R. J.; LANCASTER, W. D. Tissue effects of and host response to human papillomavirus infection. **Dermatologic Clinics**, v. 9, n. 2, p.203-9, 1991.
39. JENSON, A. B; LANCASTER, W. D. Human papillomaviruses. In: Textbook of Human **Virology**. 2nd. St. Louised : R. B. Belshe, Ed., 1987. p. 947-69.
40. KAMEYAMA, Y.; KOJIMA, A.; MAEDA, H.; KURAHASHI, N.; SAKAGAMI, G.; KUBO, K.; YOSHIMOTO, H. Human papillomaviruses in the normal oral cavity of children in Japan. **Oral Oncology**, v. 39, n. 8, p.821-28, Dec. 2003.
41. KANESHIMA, E. N.; BIDOIA, C.C.G; GABRIEL, M.; SUZUKI, L.E.; CONSOLARO, M.E.L. Aplicação do método PCR-RFLP para tipagem de HPV em infecções cervicais de pacientes atendidas no Lepac, Universidade Estadual de Maringá. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 3, p. 731-37, jun. 2001.
42. KIGNEL, S. HPV Bucal. In: **HPV na Prática Clínica**. In: _____. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 12, p.157-164.
43. KIRNBAUER, R.; HUBBERT, N. L.; WHEELER, C. M.; BECKER, T. M.; LOWY, D. R.; SCHILLER, J. T. A virus-like particle enzyme-linked immunosorbent assay detects serum antibodies in a majority of women infected with human papillomavirus type 16. **Journal of The National Cancer Institute**, v. 86, n. 7, p.494-9, Apr. 1994.
44. LAZZARI, C. M.; KRUG, L.P.; QUADROS, O. F.; BALDI, C. B.; BOZZETTI, M. C. Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. **Journal of Oral Pathology Medicine**, v. 33, n. 5, p. 260-3, May. 2004.
45. LAVOIE, M. C.; MARCOTTE, H. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n.1, p. 71-109, Mar. 1998.
46. LEHNER, T. **Imunologia das doenças da boca**. In: _____. 3. ed. São Paulo: Santos Livraria Editora, 1996a. cap. 1, p.1-8.

47. LEHNER, T. **Imunologia das doenças da boca**. In: _____. 3. ed. São Paulo: Santos Livraria Editora, 1996b. cap.2, p.171-72.
48. LIEBERT, U. G.; REMMERBACH, T. W.; BRINCKMANN, U. G.; HEMPRICH, A.; CHEKOL, M.; KÜHNDEL, K. PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. **Journal of Clinical Virology**, v. 30, n. 4, p. 302-8, Aug. 2004.
49. MADRID, R. M.; LÓPEZ, E. M.; REGALADO, M. A.; BRGADO, B. La saliva como medio de diagnóstico de HIV. **Revista Cubana de Estomatologia**, v. 37, n. 3, p. 146-56, 2000.
50. MEHTA, C. R.; PATEL, N. R. A network algorithm for performing Fisher's exact test in R x C contingency tables. **Journal American Statistical Association**, v. 78, n. 382, p. 427-34, Jun. 1983.
51. MILLER, C. S.; WHITE, D. K. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 82, n. 1, p. 57-68, Jul. 1996.
52. MOUNTS, P.; SHAH, K. V. Respiratory papillomatosis: etiologic relation to genital tract papillomatovirus. **Progress in Medical Virology**, v. 24, p. 90-114, 1984.
53. NAKAGAWA, M.; VISCIDI, R.; DESHMUKH, I.; COSTA, M. Da.; PALEFSKY, J. M.; FARHAT, S.; MOSCICKI, A. Time course of humoral and cell-mediated immune responses to Human Papillomavirus type 16 in infected women. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 4, p. 877-82, July. 2002.
54. NEVILLE, B.W.; DAMM,D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. Patologia Epitelial. In: _____. **Patologia Oral & Maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1998. cap. 10, p.252-313.
55. NICOLAU, J.; LEITE, M. F.; SIQUEIRA JR, W. L.; NOGUEIRA, F. N. Saliva na saúde e na doença. **Revista da APCD**, v. 57, n. 4, p. 304-8, jul/ago. 2003.
56. OLIVEIRA, M. C.; SOARES, R. C.; PINTO, L. P.; COSTA, A. de L. L. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 69, n. 4, p. 553-59, jul/ago. 2003.
57. PARELLADA, C. I.; PEREYRA, E. A. G.; Novas terapêuticas. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E. R.; LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G. **HPV na Prática Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 8. p. 117-130.
58. PEREYRA, E. A. G; PARELLADA, C. I. HPV nas mulheres. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E. R.; LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G. **HPV na Prática Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 5. p. 59-82.
59. PINTO, A. P.; TULIO, S.; CRUZ, O. R. Co-Fatores do HPV na Oncogênese Cervical. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 1, p. 73-8, Jan/Mar. 2002.

60. PURANEN, M.; YLISKOSKI, M. H, SAARIKOSKI, S.V.; SYRJÄNEN, K.J.; SYRJÄNEN, S.M. Exposure of infant to cervical human papillomavirus infection of the mother is common. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 176, n. 5, p. 1039-45, May. 1997.
61. PRAETORIUS, F. HPV-associated disease of oral mucosa. **Clinical in Dermatology**, V.15, p.399-413, 1997.
62. RAPAPORT, D. Biologia do HPV. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E. R.; LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G. **HPV na Prática Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 2, p.7-23.
63. REGESI, J. A.; SCIUBBA, J. J. Lesões Verrucosas-Papilares. In: REGESI, J. A.; SCIUBBA, J. J. **Patologia Bucal Correlações Clinicopatológicas**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.6, p. 144-57.
64. ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E. R.; LUCON, A. M. Patogênese e a importância do homem como transmissor. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E. R.; LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G. **HPV na Prática Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 3 p. 25-37.
65. SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M.T.V.; NIGG, M.D. Vírus Oncogênicos. In: _____. **Introdução à Virologia Humana**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 204-211.
66. SCHRAMM, W.; ÂNGULO, G. B.; TORRES, P. C.; BURGUESS-CASSLER, A. A simple saliva-based test for detecting antibodies to human immunodeficiency virus. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 6, n. 4, p. 577-580, July. 1999.
67. SCOTT, M.; NAKAGUAWA, M.; MOSCICKI, A. Cell-Mediated Immune Response to Human papillomavirus Infection. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 2, p. 209-220, Mar. 2001.
68. SELLORS, J. W.; MAHONEY, J. B.; KACZOROWSKI, J. Prevalence and predictors of Human Papillomavirus infection in women in Ontario, Canada. **Canadian Medical Association Journal**, v. 163, n. 5, p. 503-8, Sept. 2000.
69. SHAH, K.V.; HOWLEY, P.M. Papillomaviruses. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M. **Virology**. 2 ed. Ney York: Raven Press LTDA, cap.59, 1990.
70. SICHERO, L.; BOCCARDO, E.; VILLA, L. L. Métodos De diagnóstico. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E. R.; LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G. **HPV na Prática Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 6. p. 83-94.
71. STANLEY, M. A. Mechanism of action of imiquimod. **Papillomavirus Report**, v. 10, n.2, p.23-29, 1999.
72. SUGAWARA, S; UEHARA, A.; WATANABE, K.; ECHIGO, S.; SATO, M.; YAMAGUSHI, T.; TAKADA, H. Constitutive expression of a bacterial pattern recognition receptor, CD14, in human salivary glands and secretion as a soluble form in saliva. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 2, p. 286-92, Mar. 2003.

73. SUGIYAMA, M.; BHAWAL, U.K.; DOHMEN, T.; SHIGEHIRO, O; MIYAUCHI, M.; ISHIKAWA, T. Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 95, n. 5, p. 594-600, May. 2003.
74. SUMMERSGILL, K. F.; SMITH, E. M.; LEVY, B.; ALLEN, J. M.; HAUGEN, T. H.; TUREK, L. P. Human papillomavirus in the oral cavities of children and adolescents. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 91, n. 1, p. 62-9, Jan. 2001.
75. STRECKFUS, C. F.; BIGLER, L. R. Saliva as a diagnostic fluid. **Oral Diseases**, v. 8, Issue 2, p. 69-76, Mar. 2002.
76. SYRJÄNEN, S.; RINTALA, M.; GRÉNMAN, S.; PURANEN, M. Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: a prospective finnish HPV family study. **Journal of Clinical Virology**, v. 35, n. 1, p. 89-94, Jan. 2006.
77. TERAJ, M.; HASHIMOTO, K.; YODA, K.; SATA, T. High prevalence of human papillomavirus in the normal oral cavity of adults. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 14, n. 4, p. 201-5, Aug. 1999.
78. TERAJ, M.; BURK, R. D. Complete nucleotide sequence and analysis of a novel human papillomavirus (HPV) genome cloned by an overlapping. PCR Method. **Virology**, v. 279, n. 1, p. 109-15, Jan. 2001.
79. TEWARI, K. S.; DISAIA, P. J. Primary prevention of uterine cervix cancer: focus on vaccine history and current atrategy. **Obstetrics and Gynecology Clinics of North America**, v. 29, n. 4, p. 843-68, Dec. 2002.
80. TORACINI, das DORES, G. Epidemiologia do HPV. In: ROSENBLATT, C.; WROCLAWSKI, E. R.; LUCON, A. M.; PEREYRA, E. A. G. **HPV na Prática Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. cap. 1, p. 1-5.
81. ZHOU, J.; GISSMANN, L.; ZENTGRAF, H.; MULLER, H.; PICKEN, M.; MULLER, M. Early phase in the infection of cultured cells with papillomavírus virions. **Virology**, v. 214, n. 1, p. 167-76, Dec. 1995.
82. ZMUDA, J.F.; WAGONEER, B.; LIOTTA, L.; WHITELEY, G. Recognition of multiple classes of hepatitis C antibodies increases detection sensitivity in oral fluid. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, n. 6, p. 1267-70, Jul. 2001.

10 ANEXOS

ANEXO I

PESQUISA CIENTÍFICA

I – Dados de identificação do paciente

Registro na pesquisa:		Registro no hospital:	
Nome do paciente:			
Documento de Identidade nº:	Gênero:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:		Cidade:	
U.F.	CEP:	Telefone:	

II – Dados de identificação do Pesquisador Responsável

Nome: Andréa Padre Peixoto	
Cargo/Função: Mestranda PPGim	Unidade: Instituto de Ciências da Saúde – UFBA
Profissão: Cirurgiã-Dentista	CRO-BA: 6198

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

III- Pesquisa científica

Título: *Deteção do Papilomavírus humano na cavidade bucal de pacientes com infecção por este vírus na mucosa cérvico-vaginal.*

Objetivo: Esta pesquisa tem como objetivo identificar a presença do *Papiloma Vírus Humano* (HPV) na mucosa da boca de pacientes que manifestam esta infecção no colo uterino e vagina.

Justificativa: Os resultados da biópsia de seu material coletado da região cérvico-vaginal, mostram alterações celulares compatíveis com a presença do Papiloma Vírus Humano (HPV). Desta forma, você está sendo convidada a participar voluntariamente de um estudo a respeito da possibilidade da autotransmissão desse vírus para a cavidade bucal.

As pacientes do serviço de ginecologia do Hospital Santo Antônio serão selecionadas para compor a amostra deste estudo. Os critérios de inclusão das pacientes serão: 1- mulheres com vida sexual ativa, 2- apresentando biópsia da região cérvico-vaginal que indique lesões celulares provocadas pelo *Papiloma Vírus Humano*, 3- não submetidas a procedimentos terapêuticos. Informações sobre hábitos de vida deverão ser fornecidas cujas perguntas estão em um questionário em anexo. Será realizado exame dos tecidos moles da boca, coleta de amostras da saliva e realização de esfregaços da mucosa bucal dessas pacientes. Para a obtenção deste material serão utilizadas técnicas não invasivas, rápidas e indolores evitando desconforto para a paciente. Na realização desta coleta, serão utilizados materiais estéreis e descartáveis. Em seguida, as amostras serão submetidas a testes laboratoriais da biologia molecular. Serão submetidas a biópsia somente as pacientes que apresentarem manifestações na boca compatíveis clinicamente com lesões provocadas por esse vírus.

Participação Voluntária: A sua participação é estritamente voluntária e você poderá se recusar a participar da pesquisa. Estará garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento ou deixar de participar do estudo, sem qualquer penalidade. Esta pesquisa inclui um questionário que deverá ser respondido por você, exame físico dos tecidos moles da boca, coleta de saliva e esfregaço da mucosa bucal, através de uma pequena escova, sem riscos nem desconfortos. Caso você apresente alterações na boca que possam estar associadas ao vírus será realizada a biópsia. Você tem o direito de ser mantida atualizada sobre os resultados parciais da pesquisa, e caso sejam solicitadas, serão fornecidas todas as informações relativas a sua participação. Não existirá despesas ou compensações pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Entretanto a sua participação proporcionará um melhor conhecimento sobre a forma de transmissão do vírus HPV, como diagnosticá-lo precocemente, e assim futuramente beneficiar pacientes em iguais condições que as incluídas nesta pesquisa.

Dúvidas: Ocorrendo qualquer dúvida a respeito da pesquisa entre em contato com Dr^a Andréa Padre Peixoto através do telefone (71) 3235-0937, email apadre@ufba.br, Laboratório de Virologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, situado na Av. Reitor Miguel Calmom S/N, Vale do Canela ou com Dr^a Sírnia Santana, coordenadora do Comitê de Ética Pesquisa do Hospital Santo Antônio, situado na Av. Bonfim, 161, Roma, Salvador, Bahia, fone: (71) 3310-1627.

Duração da Pesquisa: O período compreendido para a presente pesquisa é de 24 meses.

Confidencialidade: Os dados coletados serão utilizados somente para fins de pesquisa e os resultados deverão ser divulgados através de artigos científicos, em revistas especializadas e/ou em encontros científicos e congressos, sem nunca tornar possível sua identificação.

Assinaturas: Para aderir ao estudo, você deverá assinar logo a seguir um termo de consentimento esclarecido, somente se:

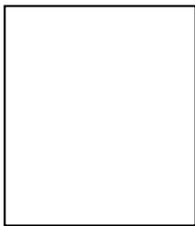
- Leu ou foi lido para você, e entendeu todas as informações contidas nesse termo e pensou sobre o assunto. Ficaram claros os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes.
- Todas as suas dúvidas foram respondidas a contento. Caso não tenha compreendido qualquer uma das palavras, solicitou ao responsável pela pesquisa que te esclarecesse.
- Concordou voluntariamente em participar da pesquisa e compreendeu que poderá desistir a qualquer momento.
- Recebeu uma cópia do termo de consentimento esclarecido que permanecerá em suas mãos.

Termo de consentimento Livre e Esclarecido:

Eu, _____, declaro participar voluntariamente da pesquisa científica intitulada: "*Deteção do Papilomavírus humano na cavidade bucal de pacientes com infecção por este vírus na mucosa cérvico-vaginal*", desenvolvida por Dr^a Andréa Padre Peixoto. Acredito ter sido convenientemente esclarecida à respeito das informações que li ou que foram listadas para mim. Ficaram claros os objetivos da pesquisa, os procedimentos a serem realizados e que a minha participação é isenta de despesas e gratificações e que tenho garantia do acesso aos resultados a qualquer tempo bem como da confidencialidade dos mesmos. Estou ciente de que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem penalidade ou prejuízo. Também declaro ciência que os procedimentos a serem adotados respeitam as respectivas declarações e resoluções que reza sobre o assunto.

Assinatura do Paciente

Data ____ / ____ / ____



Impressão datiloscópica do paciente

Assinatura da Testemunha

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do Pesquisador

Data ____ / ____ / ____

ANEXO II

**Universidade Federal da Bahia**

Questionário – Pesquisa em HPV Oral

Mestrado em Imunologia/PPGIm – Andréa Padre Peixoto

Data: ____/____/____ Entrevistador: _____

Registro na pesquisa: _____ Registro no hospital: _____

IDENTIFICAÇÃO

1 - Sexo: F() M()	5 - Naturalidade:
2 - Idade:	6 - Profissão:
3 - Cor:	7 - Ocupação:
4 - Estado Civil: Solteiro() Casado ()	8 - Grau de escolaridade: () sem escolaridade () 1 grau () 2 grau () 3 grau

CONDIÇÃO DE SAÚDE BUCAL**9) Qual a frequência de escovação?**

- () 1 vez por dia
 () 2 vezes por dia
 () 3 vezes por dia ou mais
 () não escova diariamente

10) Faz uso do fio dental? Sim () Não ()*a) Qual a frequência do uso do fio dental?*

- () 1 vez por dia
 () 2 vezes por dia
 () 3 vezes por dia ou mais
 () não usa o fio dental diariamente

11) Faz uso de enxaguatórios bucais? Sim () Não ()**12) Utiliza outros recursos de higiene oral? Sim () Não ()**

Especifique: _____

13) Consulta o dentista regularmente? Sim () Não ()*a) Qual a frequência?*

- () 1 vez por ano
 () 2 vezes por ano
 () 3 vezes por ano ou mais

14) Já apresentou alguma doença com manifestação na boca que tenha se manifestado na mucosa? Sim ()
Não ()

a) Qual a localização?

- () lábio () assoalho de boca
() língua () mucosa jugal (bochechas)
() palato (céu da boca)

b) Conhece a etiologia (origem) dessa doença?

- () vírus () outras
() fungos () desconhecida
() bactérias

c) Qual a forma de cura?

- () espontânea () procedimentos caseiros
() medicamentos
() cirurgia

HÁBITOS

15) Você é fumante? Sim () Não ()

a) Fuma há quanto tempo?

- () menos de 1 ano
() mais de 1 ano
() mais de 5 anos
() mais de 10 anos

b) Ex-fumante?

- () menos de 1 ano
() mais de 1 ano
() mais de 5 anos
() mais de 10 anos

16) Faz uso de bebidas alcoólicas? Sim () Não ()

Com que frequência?

- () Raramente
() 1 vez por semana
() 3 vezes por semana
() mais de 3 vezes por semana

ANTECEDENTES PESSOAIS

17) Já apresentou alguma doença sexualmente transmissível?

Sim () Não () Não sabe ()

a) Qual? _____ Não sabe ()

b) Em que local a doença se manifestou? _____ Não sabe ()

DADOS DO PARCEIRO

18) Já apresentou alguma doença sexualmente transmissível?

Sim () Não () Não sabe ()

a) Qual? _____ Não sabe ()

b) Em que local a doença se manifestou? _____ Não sabe ()

PRÁTICAS SEXUAIS

19) Com que idade iniciou a prática sexual? _____

20) Pratica sexo oral no seu parceiro? Sim () Não ()

a) Com que frequência?

() sempre

() às vezes

() raramente

21) O seu parceiro pratica sexo oral em você? Sim () Não ()

a) Com que frequência pratica sexo oral?

() sempre

() às vezes

() raramente

22) Usa preservativo durante as relações?

() nunca () ocasionalmente () sempre

23) Qual o número de parceiros?

EXAME FÍSICO – Intrabucal (Tecidos Moles)

1.Localização	
2.Forma:	3.Tamanho:
4.Cor:	5.Superfície:
6.Consistência:	7.Inserção:
8.Sinais Secundários:	

Sangramento, infecção, necrose, fistula, úlcera, trismo, enfartamento ganglionar

ANEXO III



HOSPITAL SANTO ANTÔNIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Salvador, 08 de junho de 2004.

De: Dra. Círia Santana
Coordenadora do CEP

Para: Dra. Andréa Padre Peixoto

Prezada Sra.

Cumpre-nos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Santo Antônio aprovou, na reunião ordinária de 07 de junho de 2004, o Projeto de Pesquisa nº 06/04, intitulado "**Detecção precoce do papiloma vírus na cavidade oral de pacientes de alto risco de infecção**".

Reiteramos a necessidade de ser encaminhado relatório periódico até 07/12/2004 (6 meses após aprovação) ou relatório final, se o término ocorrer antes dessa data.

Atenciosamente


Dra. Círia Santana
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital Santo Antônio

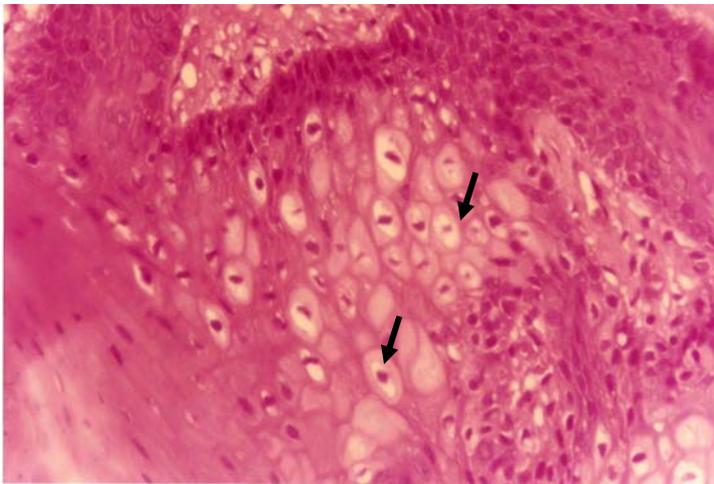
ANEXO IV

ANATOMIA PATOLÓGICA

Das 100 pacientes examinadas, 02 foram submetidas a biópsia, cujos laudos correspondem:

- A) Características clínicas: lesão nodular, ovadala, localizada na mucosa jugal esquerda a 1,5cm da comissura labial esquerda, rosa-pálido, apresentando 0,2cmx0,1cm, séssil e áspera.
Laudo: Fibroma.
- B) Características clínicas: lesão nodular, ovadala, localizada no pilar amigdaliano posterior esquerdo, rosa-coral, apresentando 0,2cmx0,2cm, pediculada e rugosa.
Laudo: Papiloma.

7.A



7.B

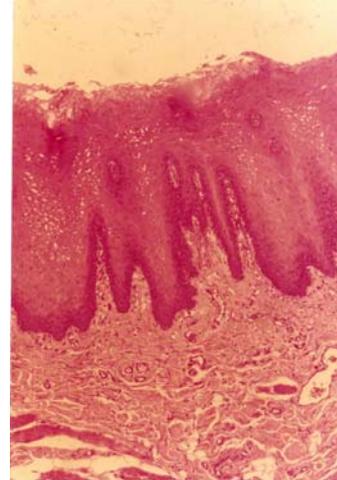


Figura 3. Fotomicrografia de papiloma de orofaringe.

- A) Células coilocitóticas com evidente halo perinuclear. Setas.
B) Projeções papilares do epitélio escamoso.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)