

# Determination of HPV prevalence in oral/oropharyngeal mucosa samples in a rural district of São Paulo

*Determinação da prevalência de HPV em amostras de mucosa oral/orofaríngea em um distrito rural de São Paulo*

Vitor Breseghello Cavenaghi<sup>1</sup>, Elias Jean Eid Ghosn<sup>1</sup>, Natália Cruz<sup>2</sup>, Lia Mara Rossi<sup>3</sup>, Leonardo da Silva<sup>4</sup>, Henrique Olival Costa<sup>4</sup>, Luísa Lina Villa<sup>5</sup>

## Keywords:

mouth;  
oropharynx;  
papillomavirus infections;  
polymerase chain  
reaction.

## Abstract

**K**nowledge about HPV infection in the oral cavity/oropharynx may contribute to the elucidation of the role it plays in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). **Objective:** To determine the effectiveness of the methodology used for sampling the oral cavity and oropharynx mucosae and to determine the prevalence of HPV in the oral cavity and oropharynx of adults and children. **Method:** The study population was served by an assistance program in a rural district of São Paulo. The subjects were asked to donate samples regardless of complaints. **Results and Conclusion:** The study included 47 men, 77 women and 22 children, of which the oral cavity samples were obtained by gargling with commercially-available antiseptic mouthwash. We found 3 positive samples (2.4%) in adults: 2 HPV 55 and one HPV 58. No positive results were found in children. Furthermore we concluded that the sampling method with the mouthwash proved effective and fast for the detection of HPV in the oral cavity and oropharynx in the general population.

## Palavras-chave:

boca;  
infecções por  
papillomavirus;  
orofaríngea;  
reação em cadeia da  
polimerase.

## Resumo

**O** conhecimento sobre a infecção por HPV na mucosa oral/orofaríngea pode contribuir para a elucidação de seu papel no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECCP). **Objetivo:** Averiguar a eficácia da metodologia para coleta de amostras em cavidade oral e orofaríngea e determinar a prevalência do HPV na cavidade oral e orofaríngea de adultos e crianças. **Método:** A população estudada foi atendida por um programa assistencial em um distrito rural de São Paulo. Os indivíduos foram convidados a doar amostras independentemente de queixas. **Resultados e Conclusão:** Foram incluídos no estudo 47 homens, 77 mulheres e 22 crianças, dos quais amostras da cavidade oral foram obtidas por bochecho e gargarejo com antisséptico oral comercial. Foram encontrados três resultados positivos (2,4%) em adultos, duas amostras de HPV 55 e uma amostra de HPV 58. Não foram observados resultados positivos em crianças. Além disso, concluímos que o método de coleta com o enxágue bucal com antisséptico mostrou-se eficaz e rápido para a detecção de HPV na cavidade oral e orofaríngea na população geral.

<sup>1</sup> Acadêmico de Medicina (Acadêmico de Medicina da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo).

<sup>2</sup> Ensino Superior (Colaboradora da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo).

<sup>3</sup> Doutorado (Colaboradora da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo).

<sup>4</sup> Doutorado (Professor Assistente de Otorrinolaringologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo).

<sup>5</sup> Doutorado (Coordenadora do Instituto do HPV (INCT-HPV), Santa Casa de São Paulo).

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP).

Endereço para correspondência: Vitor Breseghello Cavenaghi. Rua Cesário Mota Júnior, nº 112. Vila Buarque. São Paulo - SP. Brasil. CEP: 01221-020.

Tel: +55 (11) 2176-7232. E-mail: cavenaghi.vb@gmail.com

Esse estudo teve suporte financeiro do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do HPV (INCT-HPV) através de recursos do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), processo 573799/2008-3, e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 57889-1.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) do BJORL em 3 de março de 2013. cod. 10630.

Artigo aceito em 29 de junho de 2013.

---

## INTRODUÇÃO

---

O papilomavírus humano (HPV) é uma das causas mais comuns de infecção sexualmente transmissível em todo o mundo. Embora onexo causal entre o HPV de alto risco e carcinoma cervical esteja bem estabelecido<sup>1</sup>, a implicação desta infecção viral em carcinoma espinocelular da cabeça e pescoço (CECCP) permanece incerta. O Brasil apresenta uma das maiores incidências de CECCP do planeta, sendo estimados 20.280 novos casos em 2012<sup>2</sup>.

Muito deste desconhecimento se dá pela falta de evidências conclusivas quanto à prevalência da infecção da cavidade oral pelo HPV. Os estudos existentes lançam mão de metodologias diversas, seja na amostragem ou na detecção do HPV, e acabam por trazer resultados diferentes.

Com base na literatura, os tipos de HPV de alto risco têm sido regularmente detectados em 16% a 33% em carcinomas espinocelulares (CEC) de cavidade oral, de 28,2% a 47% em CEC de orofaringe e de 13,8% a 48,5% em CEC de laringe<sup>3</sup>.

Como observado nos carcinomas do colo do útero, os CECCPs HPV+ são adquiridos predominantemente por via de transmissão sexual<sup>4,5</sup>. Todavia, especialmente em pacientes com papilomatose laríngea, uma transmissão vertical de mãe para fetos durante a gravidez e o parto possa existir, indicando que o papilomavírus humano pode ser transmitido tanto sexualmente como não sexualmente. Detecção do DNA HPV no líquido amniótico, nas membranas fetais, cordão umbilical e células trofoblásticas placentárias sugerem a infecção pelo HPV no útero, ou seja, transmissão pré-natal<sup>6</sup>.

Uma vez que temos a disponibilidade de instrumentos de prevenção como a vacina contra o HPV<sup>7</sup>, e considerando a lógica de que as políticas de saúde devem previamente determinar o impacto de qualquer intervenção de acordo com sua relação custo/benefícios, observamos que há a necessidade de estabelecer parâmetros regionais para escolher populações mais propensas para implementar políticas de prevenção de CECCP. Sabendo da dimensão continental do Brasil, o emprego de metodologia simples, rápida e eficaz de verificação da prevalência de HPV pode ajudar na condução de mais estudos em diferentes regiões do país e do mundo.

Os objetivos desse estudo foram: averiguar a utilidade do emprego de enxágue bucal com antisséptico oral para coleta de amostras em cavidade oral e orofaringe, comparando a prevalência do HPV na estudada com dados da literatura.

---

## MÉTODO

---

O presente trabalho foi realizado com prévia aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com número de protocolo: 419/10.

A população estudada participou do programa assistencial realizado em 2011 em Votuporanga (latitude 20°25'22" sul e longitude 49°58'22" oeste), São Paulo, Brasil. Toda a população atendida pelo programa assistencial teve avaliação otorrinolaringológica, independentemente da presença de queixas durante a anamnese e triagem. Foram arrolados no estudo todos os indivíduos participantes do programa assistencial realizado na cidade, que foram esclarecidos quanto à pesquisa e aceitaram participar após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Foram excluídos do estudo todos aqueles que não aceitaram participar do mesmo.

Homens, mulheres e crianças a partir de 4 anos de idade foram incluídos no estudo. Destes pacientes, foram coletadas amostras de células provenientes da boca e orofaringe obtidas por descamação após enxágue e gargarejo com antisséptico oral comercial (PLAX, Colgate, sem álcool). Os indivíduos foram orientados para evitar o consumo de qualquer tipo de alimento ou líquidos, além de serem removidas próteses dentárias cerca de 30 minutos antes da coleta. O participante foi então orientado para que fizesse um enxágue da cavidade oral com uma dose única de 15 ml do enxaguante bucal, bochechando vigorosamente por aproximadamente 15 segundos em toda a superfície da boca. Em seguida, foi orientado a inclinar a cabeça para trás e gargarejar por outros 15 segundos. Transcorrido esse tempo, a solução foi cuspidada de volta ao tubo cônico de 50 ml previamente etiquetado.

Imediatamente após a coleta, todas as amostras foram mantidas em geladeira (4°C) por um período máximo de 48 horas, quando então foram transportadas em ambiente refrigerado para a cidade de São Paulo e processadas. Os testes para extração de DNA e PCR foram realizados de acordo com protocolo rotineiro. O DNA foi extraído e purificado de acordo com instruções do *Roche's AmpliLute Liquid Media Extraction Kit (Roche Mol Diagnostics, California, USA)*, sendo quantificado em um espectrofotômetro de espectro completo da fabricante Nanodrop<sup>TM</sup>. Quantidades iguais de DNA foram submetidas à detecção de DNA de HPV e tipagem pela reação em cadeia da polimerase (PCR) com *Linear Array HPV Genotyping kit (Roche Mol Diagnostics, CA, USA)*. Foram utilizados iniciadores biotinilados para uma região polimórfica de 450 pares de base de L1 do genoma do HPV e outro par de iniciadores para o gene

de beta-globina humana, usado como controle da qualidade do DNA, seguindo instrução do fabricante. Esse método permite a detecção de 37 tipos diferentes de HPV e foi validado em diferentes estudos conduzidos pelo mundo.

## RESULTADOS

De 166 indivíduos convidados para o estudo, 145 (87,3%) concordaram em participar, assinaram o termo de consentimento e foram incluídos no estudo. Foram coletadas amostras de 77 mulheres adultas entre 20 e 74 anos (idade média  $\pm$  desvio padrão = 45,3  $\pm$  15,4), 47 homens adultos entre 18 e 89 anos (idade média  $\pm$  desvio padrão 51,4  $\pm$  16,8) e 21 crianças entre 4 e 17 anos (idade média  $\pm$  desvio padrão 10,1  $\pm$  4,2). As características sociodemográficas da população participante do estudo estão na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características sociodemográficas.

	Adultos n (%)	Crianças n (%)
Participantes	124	21
Idade média (em anos)	47,61	10,1
Sexo		
Masculino	47 (37,9)	7 (33,3)
Feminino	77 (62,1)	14 (66,7)
Escolaridade		
Analfabeto	19 (15,4)	3 (14,3)
Ensino fundamental	75 (60,5)	13 (61,9)
Ensino médio	23 (18,5)	5 (13,8)
Ensino superior	7 (5,6)	0 (0)
Raça		
Branco	84 (67,7)	12 (57,1)
Negro	13 (10,4)	4 (19)
Pardo	27 (21,9)	4 (19)
Amarelo	0 (0)	1 (4,9)
Situação conjugal		
Solteiro	22 (17,7)	20 (95,2)
Casado	82 (66,1)	1 (4,8)
Divorciado	8 (6,4)	0 (0)
Viúvo	12 (9,8)	0 (0)
Tabagismo		
Uso	93 (75)	0 (0)
Não uso	31 (31)	21 (100%)
Bebida alcoólica		
Uso	46 (37,1)	2 (9,5)
Não	78 (62,9)	19 (90,5)

O DNA foi isolado com sucesso em todas as amostras. Além disso, todas as amostras apresentaram beta-globulina, indicando boa qualidade do material submetido à PCR. Foram obtidos três resultados positivos em adultos, com a prevalência de 2,4%. Os tipos de HPV encontrados foram HPV 55, em duas amostras, e HPV 58, em uma. Não foram observados resultados positivos em crianças (Tabela 2).

**Tabela 2.** Prevalência de DNA de HPV em amostras orais.

HPV	Frequência n (%)	Tipos
Adultos	124	-
Positivo	3 (2,4)	2 positivos para tipo 55 1 positivo para o tipo 58
Negativo	121 (97,6)	-
Crianças	21	-
Positivo	0 (0)	-
Negativo	21 (100)	-

## DISCUSSÃO

Em estudo que avaliou a prevalência de infecção por HPV em mucosa oral e orofaríngea, em 1.688 homens saudáveis do México, EUA e Brasil, foi encontrado um número de 4% de infecções por HPV, sendo que 1,3% foram positivas para HPV-16, tipo mais prevalente nessa população<sup>8</sup>. Considerando-se apenas adultos da população avaliada em Votuporanga, a prevalência de HPV foi de 2,4%. Na população infanto-juvenil, não foi encontrada a presença de HPV, resultado dentro do esperado, já que estudos demonstram que é baixa a prevalência de HPV na cavidade oral de indivíduos menores de 18 anos, fator que pode estar relacionado ao aumento da prevalência encontrada em sujeitos que iniciaram a vida sexual<sup>9</sup>. Nesse sentido, em estudo realizado com 4.150 crianças e adolescentes poloneses entre 10 e 18 anos a prevalência encontrada foi de 1,08%, sendo o HPV do tipo 11 o mais prevalente<sup>10</sup>.

Em estudo realizado por Esquenazi et al.<sup>11</sup>, foram avaliados 100 indivíduos sadios com o uso do método de escovado bucal e verificou-se 0% de prevalência de HPV. Da mesma maneira, em estudo realizado com 30 mulheres, que apresentavam verrugas genitais, pelo método de *swab*, também não foram observadas amostras positivas<sup>12</sup>. Em outro estudo, pelo método de *swab*, foram detectadas 23,2% de amostras positivas para HPV em uma população de 125 indivíduos sem manifestação de lesões orais<sup>13</sup>.

Kreimer et al.<sup>8</sup> utilizaram o mesmo protocolo para a coleta das amostras celulares de cavidade oral e orofaríngea adotado pelo presente estudo. Já no estudo realizado por Durzyńska et al.<sup>10</sup>, o método utilizado foi o bochecho

com 5 ml de solução salina. Outros estudos utilizam o método de *swab* para a obtenção de amostras<sup>11-13</sup>.

Das três amostras positivas do estudo, duas delas foram do tipo 55 e uma de HPV 58, coincidindo com os tipos também encontrados no estudo de Kreimer et al.<sup>8</sup>, em homens adultos, e Durzyńska et al.<sup>10</sup>, em crianças.

As principais limitações do presente estudo são com relação ao baixo número de participantes, na proporção entre adultos e crianças e mesmo na impossibilidade de caracterização da população sobre hábitos e comportamento sexual. No entanto, a metodologia empregada demonstra a viabilidade da condução de estudo sobre prevalência de HPV em uma região com baixos recursos tecnológicos, limitação de tempo e espaço, com resultados similares aos disponíveis na literatura.

---

### CONCLUSÃO

---

O método de coleta com o enxágue utilizando antisséptico bucal mostrou-se rápido e eficaz para a detecção de HPV na cavidade oral e orofaríngea, evidenciado pela presença de DNA em todas as amostras e pelo controle da PCR pelo gene beta-globulina, positivo em todas as amostras.

Foram encontradas três (2,4%) amostras positivas para HPV na cavidade oral e orofaríngea da população adulta participante do estudo e nenhuma amostra positiva para a população de crianças. Os tipos de HPV encontrados foram HPV 55, em duas amostras, e uma com HPV 58. Estes dados estão de acordo com a literatura, mostrando baixa prevalência de HPV em mucosa oral e orofaríngea de indivíduos saudáveis.

---

### REFERÊNCIAS

---

1. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):362-72. PMID: 15187189 DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.68.2.362-372.2004>
2. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca; 2011.
3. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467-75. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-04-0551>
4. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010;11(8):781-9. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70017-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70017-6)
5. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(19):1944-56. PMID: 17494927 DOI: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa065497>
6. Shykhon M, Kuo M, Pearman K. Recurrent respiratory papillomatosis. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2002;27(4):237-43. PMID: 12169123 DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2273.2002.00555.x>
7. Villa LL. HPV prophylactic vaccination: The first years and what to expect from now. *Cancer Lett.* 2011;305(2):106-12. PMID: 21190794 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2010.12.002>
8. Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20(1):172-82. DOI: <http://dx.doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0682>
9. Koch A, Hansen SV, Nielsen NM, Palefsky J, Melbye M. HPV detection in children prior to sexual debut. *Int J Cancer.* 1997;73(5):621-4. PMID: 9398035 DOI: [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19971127\)73:5<621::AID-IJCI>3.0.CO;2-Z](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19971127)73:5<621::AID-IJCI>3.0.CO;2-Z)
10. Durzyńska J, Pacholska-Bogalska J, Kaczmarek M, Hané T, Durda M, Skrzypczak M, et al. HPV genotypes in the oral cavity/oropharynx of children and adolescents: cross-sectional survey in Poland. *Eur J Pediatr.* 2011;170(6):757-61. PMID: 21107606 DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-010-1345-x>
11. Esquenazi D, Bussoloti Filho I, Carvalho MGC, Barros FS. The frequency of human papillomavirus findings in normal oral mucosa of healthy people by PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2010;76(1):78-84.
12. Castro TMPPG, Bussoloti Filho I, Nascimento VX, Xavier SD. HPV detection in the oral and genital mucosa of women with positive histopathological exam for genital HPV, by means of the PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2009;75(2):167-71.
13. Tristão W, Ribeiro RM, Oliveira CA, Betiol JC, Bettini JdeS. Epidemiological study of HPV in oral mucosa through PCR. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2012;78(4):66-70. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1808-86942012000400013>