

I. INTRODUÇÃO

1. Cancro oral: bases do processo de cancerização, epidemiologia e factores de risco

O cancro da cabeça e pescoço, classificado como o sexto tumor maligno mais prevalente em todo o mundo e com cerca de 900 mil casos diagnosticados anualmente, apresenta, numa média de 48% de casos, o cancro oral como principal subtipo e que, por sua vez, afecta estruturas que tornam possível a execução de actividades fundamentais como a comunicação, respiração e mastigação. Assim, e de acordo com a Classificação Internacional de Doenças (ICD10) os locais anatómicos que poderão ser afectados pelo cancro oral são: lábio (C00), base da língua (C01), outros locais indeterminados da língua (C02), gengivas (C03), assoalho da boca (C04), palato (C05), outras partes indeterminadas da cavidade oral (C06), glândula parótida (C07), outras e não especificadas glândulas salivares maiores (C08), amígdalas (C09) e orofaringe (C10). Importa ressaltar que não existe uma definição estandardizada entre os autores quanto à delimitação anatómica exacta desta patologia, sendo mesmo causa de inconsistências em alguns estudos; no entanto, a selecção das áreas anteriormente referidas parece ser a definição mais consensual nos artigos recentes consultados (Duray et al. 2012; Noguti et al. 2012; Vargas-Ferreira et al. 2012; Lee et al. 2013).

Face aos elevados índices de mortalidade e morbidade que se encontram associados à patologia oncológica oral torna-se, impreterivelmente, necessária a explanação das bases moleculares do comportamento da célula cancerosa para um melhor entendimento dos factores e manifestações clínicas que lhe estão subjacentes e combater, desta forma, a realidade supracitada através de abordagens mais efectivas.

De uma forma geral, ao processo de cancerização estão imbricados conceitos de biologia celular e genética molecular complexos e, ainda, não totalmente esclarecidos. No entanto, é possível definir determinados eventos básicos para que este fenómeno ocorra, independentemente do local que afecta.

De uma forma geral, o cancro é uma doença primariamente causada por alterações citogenéticas que evoluem através de várias mutações somáticas, de carácter sequencial,

resultando numa proliferação celular descontrolada. É importante sublinhar que a maioria dos cancros segue o decorrer de eventos carcinogénicos numa única célula, ou seja, têm uma origem monoclonal, característica esta que permite estabelecer a diferença entre as hiperplasias que, por sua vez, têm uma origem policlonal (Feller et al. 2010; Noguti et al. 2012).

A actuação do agente carcinogénico – físico, químico ou biológico – sobre o ADN das células traduz-se em alterações de carácter irreversível, sendo este processo designado por iniciação. No entanto, importa ressaltar que a célula não possui, ainda, um cariz de malignidade já que as características hereditárias que o conferem consistem numa proliferação descontrolada – desrespeitando os parâmetros normais da divisão celular – e na invasão e colonização de locais anatómicos destinados a outro tipo de células (metastização) o que, por sua vez, pressupõe fragmentação e capacidade de percorrer a corrente sanguínea e linfática. Esta progressão para a malignidade e a consequente redução da adesão intercelular das células tumorais pela perda de E-caderina promove a produção de proteínas como a N-caderina que conduzem ao seu alongamento, alterações na polaridade e moleculares que alteram o comportamento destas células. Assim, se à iniciação se seguir a promoção e afecção de genes determinantes, nomeadamente, de protooncogenes promotores do crescimento, genes inibidores do crescimento dos supressores do tumor, genes que regulam a apoptose e genes envolvidos no reparo do ADN, ocorre transformação maligna pelas cumulativas mutações que se originam (Alberts et al. 2004; Santos & Teixeira 2011).

Por conseguinte, as modificações cruciais para aquisição de malignidade pressupõem evasão da apoptose, em que os tumores adquirem a capacidade de resistir à morte celular programada pela inactivação do gene p53 ou outros; auto-suficiência nos sinais de crescimento, ou seja, existe actividade proliferativa sem necessidade de estímulos exógenos, com evicção da senescência programada e diferenciação; insensibilidade aos sinais inibidores do crescimento; defeitos no reparo do ADN e instabilidade genética; potencial infinito de replicação adquirida pela preservação do comprimento e da função dos telómeros; formação do aporte vascular induzida por diversos agentes, fenómeno este designado por angiogénese; e, como supracitado, a capacidade de invadir e metastizar. A carcinogénese pode, desta forma, ser perspectivada como um processo evolutivo e darwiniano em que as mutações adquiridas, progressivamente, conferem às

células transformadas um potencial de crescimento e dominância em relação às células saudáveis envolvente, resultando, ao longo do tempo, numa representação aumentada das primeiras, no tecido afectado (Feller et al. 2012).

Assim, as alterações genéticas acumuladas resultam, regularmente, numa progressão pelos estádios neoplásicos – benigno, pré-maligno e maligno – sendo que, em cada um, a célula adquire mais uma mutação que, dependendo do ambiente e das barreiras do mesmo, lhe conferirá ou não, uma vantagem selectiva perante as restantes.

No mesmo contexto surgem dois conceitos importantes, e opostos no seu significado, a ter em consideração na abordagem ao cancro – anaplasia e diferenciação – e remetem, por sua vez, para o grau de comparabilidade morfológica e funcional em relação às células normais. Apesar de não se constituir numa regra de distinção exacta, a realidade aponta para a ocorrência predominante de tumores benignos diferenciados, em oposição aos malignos que são tendencialmente anaplásicos, ou seja, não diferenciados, ao apresentarem evidências como pleomorfismo – variação de tamanho e forma – morfologia nuclear anormal com hiper cromasia do núcleo e mitoses abundantes como indicador da actividade proliferativa das células parenquimatosas (Alberts et al. 2004)(Paramio 2011).

A literatura refere vários agentes que estão na origem ou, de alguma forma, contribuem para o desenvolvimento da patologia oncológica oral – radiação ultravioleta, deficiência de ferro, síndrome de Plummer-Vinson, próteses desajustadas, etc. – mas aponta, como os dois principais responsáveis, o tabaco e o álcool. Vários autores sublinham, de igual forma, o efeito sinérgico que é verificado entre estes dois elementos e a sua aptidão em potenciar o processo de carcinogénese pela capacidade demonstrada pelo álcool em agir como um solvente dos constituintes do tabaco – nomeadamente a nitrosamina e os hidrocarbonetos policíclicos – que, por sua vez, induzem alterações nas bases de guanina dos nucleótidos do gene p53, um importante supressor tumoral (Wittekindt, C. et al., 2012).

Importa, no entanto, ressaltar que o desenvolvimento da patologia oncológica oral é complexa ao ter por base uma etiologia endógena – genética – ou exógena – ambiental e comportamental – de forma isolada ou em associação. É neste contexto que, no século

XXI, o conceito dominante do álcool e tabaco como factores principais no processo de carcinogénese é alargado para outros domínios, nomeadamente o da virologia, sendo inegável a contribuição contínua das técnicas científicas no reconhecimento de novos subtipos de cancro da cabeça e pescoço e dos seus diferentes processos de formação (Cardesa & Nadal 2011).

A incidência e taxa de mortalidade do cancro oral representam instrumentos essenciais na abordagem a esta patologia já que, implícitos a estes dados, se encontra informação sobre estádios de diagnóstico, capacidade dos serviços de saúde, tecnologia disponível e programas de saúde a desenvolver. Apesar de apresentar variações geográficas, a incidência global da oncologia oral é de aproximadamente 3% no sexo masculino e 2% no sexo feminino, na totalidade dos tumores malignos. Acomete, principalmente, indivíduos a partir da 6ª década de vida e apresenta uma das taxas mais baixas de sobrevivência num período de 5 anos, de apenas 50%. De facto, em cerca de 40% dos pacientes ocorrem metástases para os gânglios linfáticos, sendo que as suas manifestações clínicas não são detectáveis em 15 a 34% dos casos (Khalili 2008; Silveira et al. 2012; Noguti et al. 2012).

Em Portugal, o cancro oral afigura-se como uma patologia relativamente frequente e com uma taxa de mortalidade elevada. Em 2006, o Registo Oncológico Nacional assinala uma incidência de 15,72/100 000 habitantes para o sexo masculino e 5,5/100 000 para o sexo feminino, sendo a língua e a boca (que, por sua vez, inclui gengiva, pavimento da boca, palato e trígono retromolar), os locais mais afectados (Registo Oncológico Nacional, 2006; Santos, L. L., & Teixeira, L. M.; 2011). De referir que foram consideradas para os valores supracitados as áreas de C00 a C10 que inclui, segundo a definição de cancro oral, as regiões anatómicas acometidas por esta patologia (Tabela I.1). De igual forma, importa sublinhar que é mais frequente no sexo masculino, embora os casos no género feminino estejam a aumentar um pouco por todo o mundo.

Em 2011, na região Norte, 4,8% dos tumores malignos acometeram a cavidade oral e faringe, com maior incidência no sexo masculino (8% para 1,7%). A localização com a taxa mais elevada de incidência foi a língua e a boca, tal como verificado no panorama nacional (RORENO, 2011).

A sobrevivência dos doentes diagnosticados em 2005-2006, ao fim de 5 anos, nesta região do país ainda é baixa com valores de 37,8% nos homens para 51,4% nas mulheres. De igual forma, o diagnóstico da patologia oncológica nestas regiões anatómicas ainda permanece tardio, já que, de acordo com o Registo Oncológico do IPO Porto, no ano de 2008, a detecção foi efectuada quando o tumor maligno se encontrava numa fase avançada – doença não ressecável ou metastizada – em cerca de 77% dos casos na língua e 62% noutras regiões bucais (RORENO, 2008).

Nos últimos anos, taxas de incidência de vários países reportaram uma diminuição de todos os carcinomas da região da cabeça e pescoço. De acordo com Wittekindt et al., 2012, no carcinoma da cavidade oral e faringe, após uma subida significativa até 1990, as taxas de morbilidade e mortalidade diminuíram nos homens e mantiveram-se relativamente constantes nas mulheres, o que pode ser explicado pela diminuição do número de fumadores nos últimos anos. Em Portugal, o Registo Nacional Oncológico de 2001 aponta para uma taxa de incidência de tumores malignos orais de 15,3/100 000 nos homens e 3,6/100 000 nas mulheres, o que, comparando com o registo de 2006, se verifica que houve um aumento de casos registados. (Registo Oncológico Nacional, 2001) (Tabela I.1).

Outros autores sublinham, de igual forma, que apesar do consumo de álcool e tabaco ter diminuído, a incidência de carcinoma oral das células escamosas, um subtipo do cancro oral, permanece elevado, afectando um grupo de pacientes sem exposição aos factores de risco clássicos e com predilecção pelas amígdalas e base da língua. De igual forma, afecta indivíduos numa faixa etária mais nova, abaixo da 5ª década de vida (Zengel et al. 2012).

Através da análise dos dados do Registo Oncológico Nacional de 2001 e 2006, é possível observar que a taxa de incidência por grupos etários não varia muito, apresentando neste último ano um discreto aumento de casos diagnosticados em faixas etárias mais jovens.

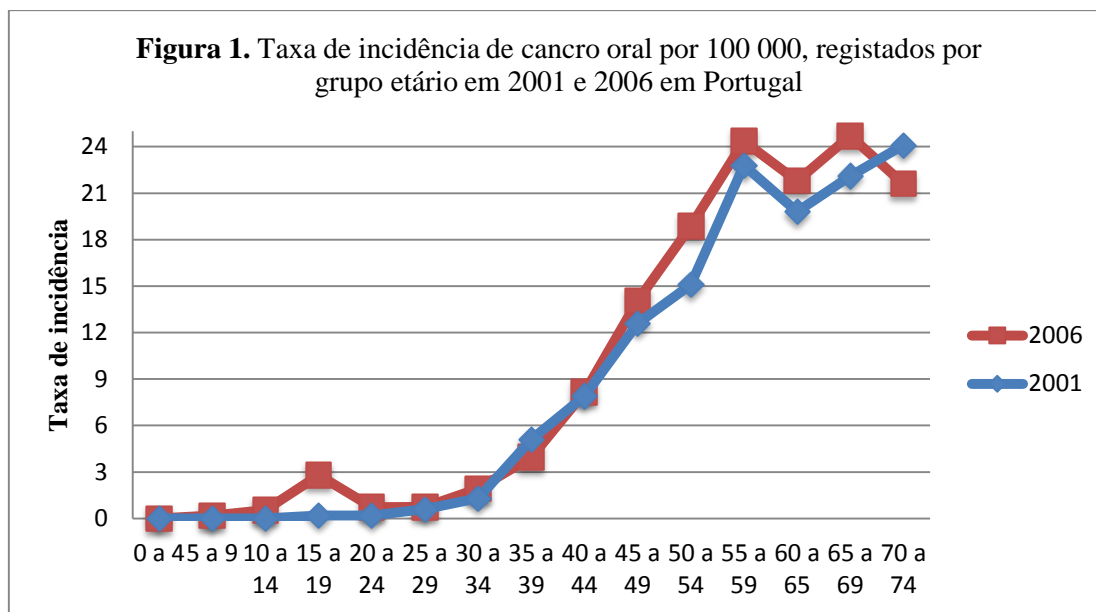
Tabela 1. Taxa de incidência do cancro oral (por 100 000 habitantes) por género e localização, em Portugal, no ano 2001 e 2006

Topografia	Taxa de incidência				Taxa de incidência padronizada (população europeia)				Taxa de incidência padronizada (população mundial)			
	2001		2006		2001		2006		2001		2006	
	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M	H	M
C00 Lábio	2,3	0,8	2,75	1,15	2,1	0,6	2,30	0,63	1,4	0,4	1,58	0,38
C01-02 Língua	4,6	1,2	4,24	1,21	4,3	0,9	3,92	0,84	3,2	0,6	2,93	0,58
C03-06 Boca	4,5	0,8	4	1,65	4,2	0,6	3,64	1,27	3,1	0,4	2,67	0,92
C07 Glândulas salivares	1	0,6	0,92	1,12	0,9	0,5	0,79	0,87	0,6	0,4	0,57	0,65
C09 Amígdala	1,6	0,1	2,09	0,26	1,5	0,1	1,96	0,21	1,2	0,1	1,48	0,15
C10 Orofaringe e outros	1,3	0,1	1,72	0,11	1,2	0,1	1,64	0,08	0,9	0,04	1,25	0,05

(adaptado de Registo Oncológico Nacional 2001 e 2006)

i. Carcinoma oral das células escamosas

O carcinoma oral das células escamosas (CCE), tumor maligno de natureza epitelial, representa o principal tipo histológico de cancro oral, assomando cerca de 90% dos casos diagnosticados. Designado por alguns autores como carcinoma epidermóide ou espinocelular, representa uma neoplasia com origem no epitélio escamoso (pavimentoso) ou com características morfológicas semelhantes a este (SÁ 2008).



(adaptado de Registo Oncológico Nacional 2001 e 2006)

Importa sublinhar que o epitélio oral é pavimentoso estratificado, queratinizado em áreas sujeitas a forças mastigatórias, existindo, sob o mesmo, tecido conjuntivo que engloba a lâmina própria, e com camadas designadas por basal, espinhosa, granular e queratinizada (Junqueira & Carneiro 2004).

No CCE, apesar do local de início ser a região basal do epitélio pavimentoso estratificado, as células acumulam-se na camada intermediária, adquirindo uma aparência escamosa. Podem, muitas vezes, afigurar-se como o estágio último das alterações do epitélio escamoso estratificado, desde a fase inicial de displasia epitelial até às mesmas romperem a membrana basal e invadirem o tecido conjuntivo; ou, por outro lado, também podem surgir “de novo”, a partir do epitélio escamoso estratificado de revestimento e sem terem uma fase pré-maligna prolongada. Assim, por outras palavras, estes tumores malignos podem surgir como uma lesão primária que se originou na cavidade bucal, como uma metástase de um local anatómico distante ou como uma extensão que provenha de um sítio adjacente à estrutura.

A complexidade de manifestações clínicas e causa multifatorial que evidencia não contribuem para a obtenção de um diagnóstico precoce. De facto, a realidade aponta para uma constância de números no que diz respeito à sobrevivência global aos 5 anos e que rondam, por sua vez, apenas 45% apesar dos progressos marcantes verificados no

modo de actuação terapêutica, tanto na área cirúrgica como nas outras modalidades de tratamento (quimioterapia e radioterapia) (Khalili 2008; Larsen et al. 2009; Tanaka et al. 2011).

Em acréscimo, o conceito de "cancerização em campo" introduzido, em 1953, por Slaughter et al. sugere a existência de alterações histológicas no epitélio em torno dos tumores o que explica, em partes, o aparecimento de recorrências mesmo após tratamento cirúrgico excisional. Esta teoria propõe, assim, uma afectação multifocal pelo agente carcinogénico o que representa, por sua vez, um desafio para os profissionais de saúde e implica um *follow-up* dos pacientes de alto risco (Jayam 2010).

ii. Motivação e objectivos

A redução de casos de cancro da cabeça e pescoço associados ao decréscimo do consumo de tabaco, com um aumento simultâneo de patologia oncológica na orofaringe, principalmente em faixas etárias mais jovens, suscitaram o interesse em investigar os cerca de 15% a 20% dos indivíduos que não apresentavam o historial tóxico supracitado.

Numa abordagem inicial à literatura disponível, artigos recentes apontaram para a presença do vírus do papiloma humano (HPV) – agente fortemente associado à patologia oncológica ano-genital e transmitido através de conduta sexual – em 25% dos cancros da cabeça e pescoço, com cerca de 30 mil casos anuais a afectar especificamente a base da língua e amígdalas. De facto, já na década de 80 esta relação tinha sido proposta, apresentando como base científica a afinidade do vírus para as células epiteliais e a semelhança das lesões manifestadas a nível oral e genital, com alguns autores a atentarem, de igual forma, para uma consistente evidencia molecular do HPV como agente causal pela expressão de três oncoproteínas virais E5, E6 e E7 (D'Souza, G. & Dempsey, A., 2011; Zengel, P. et al., 2012).

A descoberta de um agente viral como base etiológica de um tumor representaria, desde esse momento, um passo vital no entendimento da biopatologia do cancro oral, permeando o caminho para medidas de prevenção e tratamento mais eficazes (Chung,

C.H. & Gillison, M.L., 2009; Bertolus, C. et al., 2012). Até ao momento foram identificados cerca de 120 tipos de HPV categorizados em baixo e alto risco de acordo com o seu potencial oncogénico, sendo o 16 e 18 os mais frequentemente detectados em cancros potencialmente relacionados com este vírus (Prabhu, S.R. & Wilson, D.F., 2013).

No entanto, o HPV como agente etiológico para o desenvolvimento de cancro oral é, actualmente, objecto de debate e controvérsia, principalmente pelo amplo espectro de valores de ADN viral detectado nas lesões (que pode variar consoante o método de diagnóstico aplicado e apresentar valores desde 1% a 100%) e pela falta de clareza dos estudos em definir se os locais de afecção se confinam apenas à cavidade oral, orofaringe ou outros (Chung, C.H. e Gillison, M.L., 2009; Bertolus, C. et al., 2012; Martin-Hernan, F. et al., 2013).

Tendo em consideração a realidade supracitada surge justificado o propósito da presente revisão bibliográfica ao procurar clarificar como actua verdadeiramente o HPV, quais as suas características clínicas e mecanismos de infecção, as limitações e vantagens da sua detecção. Desta forma, procura-se, através da análise de estudos recentes, proporcionar o confronto dos argumentos das duas vertentes de opinião sobre se existe, de facto, uma relação significativa do vírus com o cancro oral, comparando, de igual forma, o prognóstico e manifestação clínica com os casos HPV-negativos.

Uma vez que o cancro oral apresenta uma taxa de mortalidade e morbidade acentuadas e que as mesmas estão dependentes do estágio em que é detectado torna-se evidente a importância da detecção precoce desta patologia. Ao satisfazer todos os critérios para ser considerada uma condição crónica, o cancro oral implica uma actuação proactiva e uma das formas de aumentar a taxa de sobrevivência e garantir uma melhor qualidade de vida dos pacientes, com o mínimo de sequelas, implica um exame rigoroso e atento. Apesar da complexidade e diversidade de sintomas que podem adiar a suspeita de um diagnóstico de patologia oncológica, o médico dentista é o profissional de saúde que reúne o melhor corpo de conhecimentos e capacidades para fazer o exame exo e endo-bucal, reforçando a sua responsabilidade e papel preponderante no âmbito do cancro oral e a necessidade de se manter actualizado.

iii. Métodos e instrumentos de pesquisa

No sentido de responder às questões previamente delineadas foram pesquisados artigos científicos publicados a partir de 2008, utilizando PubMed e Science Direct como motores de busca. As palavras-chave utilizadas foram *oral cancer*, *human papillomavirus*, *squamous cell carcinoma*, *cancerization*, *pathobiology*, *koilocytosis* e *risk factors*, sendo aplicadas de forma isolada ou em combinação. Os critérios de inclusão anteriormente estabelecidos foram: artigos escritos em Português, Inglês e Espanhol e acesso à versão completa. De igual forma, após a leitura dos *abstracts* foram eliminados aqueles que, apesar de preencherem os critérios, se evadiam, de alguma forma, das questões a estudar.

Para complementar a pesquisa foram também consultados livros, revistas científicas e dissertações disponíveis *online* e existentes nas bibliotecas da Universidade Fernando Pessoa e Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto. De igual forma foram estabelecidos contactos com diversos profissionais do Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil (IPO-Porto), nomeadamente dos Serviços de Epidemiologia, Virologia, Anatomia Patológica e Biblioteca.

II. DESENVOLVIMENTO

1. CARCINOMA DAS CÉLULAS ESCAMOSAS E HPV

Ao HPV é atribuída a responsabilidade de cerca de 5,25% da patologia oncológica que afecta os seres humanos, incluindo o cancro ano-genital – exhaustivamente estudado e conhecido no âmbito da epidemiologia, mecanismos de infecção e comportamento – e, mais recentemente, o cancro oral, em concreto o que afecta a orofaringe (Chung et al. 2013).

A pesquisa por uma causa infecciosa, à semelhança de outras patologias como o cancro hepático e infecção por vírus da hepatite B ou C, lançou o mote para a investigação que tem sido desenvolvida nos últimos anos (Bertolus et al. 2012; O’Rorke et al. 2012).

A associação entre o vírus do papiloma humano e o CCE foi inicialmente sugerida por uma equipa de investigadores finlandeses, liderada por Stina Syrjänen, em 1983, ao observarem que, em cerca de 40% dos cancros orais em análise, existiam semelhanças histo-morfológicas com lesões do cólo do útero associadas ao HPV (Goon et al. 2009). No seguimento desta investigação, outros autores apoiaram a teoria proposta por Syrjänen et al. com base em vários argumentos, nomeadamente: o tropismo, claramente comprovado, do HPV pelos tecidos epiteliais; as semelhanças entre o epitélio orofaríngeo e genital; a capacidade de imortalizar queratinócitos orais humanos, *in vitro*; o papel fortemente confirmado do HPV de alto risco no desenvolvimento do carcinoma das células escamosas do colo do útero; e a detecção de HPV de alto risco em amostras orais de CCE (Pannone et al. 2011).

Desde então, a evidência epidemiológica e estudos moleculares têm confluído no sentido de consolidar a relação previamente estabelecida entre o vírus e a presente patologia oncológica. Durante muitos anos, os principais factores de risco comprovados para o desenvolvimento de CCE reportaram-se aos elementos nocivos do tabaco e do álcool, isoladamente ou actuando em sinergia. Os casos de carcinoma da cabeça e pescoço compreendiam um grupo uniforme, sendo que as variações na incidência e

localização anatómica eram imputadas às diferenças culturais nos hábitos de ingestão e consumo de álcool e tabaco. No entanto, nos últimos anos, os dados epidemiológicos revelaram que a taxa de incidência de cancro da cabeça e pescoço apresentou valores mais baixos, tendência esta que foi acompanhada pelo decréscimo no consumo dos agentes acima referidos. Em forte oposição, um grupo particular de patologia oncológica – aquela que afecta a base da língua e amígdalas (orofaringe) – aumentou progressivamente, afectando um grupo particular de indivíduos com características demográficas diferentes (Cardesa & Nadal 2011).

Nos Estados Unidos, por exemplo, entre 1973 e 1995 assistiu-se a um aumento de cancro orofaríngeo, em 2 a 3% por ano, inicialmente em homens abaixo dos 60 anos de idade, mesmo perante uma diminuição do consumo de tabaco e álcool. Noutros países da Europa foi possível observar, de igual forma, um aumento de cancro orofaríngeo, afectando, contudo, os dois sexos. Um estudo na Suécia indicou, ainda, que a proporção de cancros orofaríngeos neste país, associados ao HPV, aumentou de 23% para 93%, no período de 1970 a 2007 (D'Souza & Dempsey 2011).

Os dados mais recentes realçam, assim, o importante papel do HPV como agente causal, não apenas porque o número de casos reportados de tumores da cabeça e pescoço associados ao álcool e tabaco têm diminuído, mas também pelo aumento da taxa de incidência de cancro orofaríngeo associado ao vírus. Em 2011, *International Agency of Cancer Research* (IARC) declara, neste contexto, que existe, de facto, evidência suficiente para associar o HPV, nomeadamente o tipo 16, ao cancro oral (D'Souza & Dempsey 2011; Rautava & Syrjänen 2012).

Os casos de cancro associados a esta entidade vírica têm subjacente, segundo vários autores, diferentes comportamentos de risco, tendências demográficas, características histológicas e especificidades genéticas. Os indivíduos com CCE tendem a ser mais jovens e sem os factores de risco clássicos associados (ou com baixo consumo dos mesmos), apresentando várias semelhanças com casos de carcinoma das células escamosas do colo do útero (Martin-Hernan et al. 2013).

A infecção por HPV é a mais comum das doenças sexualmente transmissíveis, apresentando um período de incubação variável e que pode resultar no desenvolvimento de uma infecção latente com um número reduzido de cópias de ADN vírico ou numa

infecção subclínica activa, mas desprovida de sinais clínicos. No entanto, de acordo com Wittekindt et al. (2012), apesar da infecção poder ser combatida pelo sistema imune, em alguns casos a infecção pode tornar-se persistente e evoluir para uma lesão pré-maligna ou maligna (Wittekindt et al. 2012).

A pele ou mucosa sem solução de continuidade são resistentes à inoculação. Por conseguinte, apenas perante falhas na integridade dos epitélios é que o HPV tem a capacidade de invadir e infectar a camada basal, mais especificamente, o núcleo destas células (Prabhu & Wilson, 2013)

Sendo o modo de transmissão do HPV predominantemente por via sexual, os factores de risco associados e, de igual forma, semelhantes ao carcinoma das células escamosas do colo útero, estão relacionados com o número de parceiros sexuais, idade jovem aquando da primeira relação sexual, prática de sexo oral e historial de verrugas genitais em idade precoce. Importa ressaltar que a par destas fontes de transmissão horizontal, alguns autores apontam para uma transmissão vertical – *in utero* – em cerca de 20% dos casos, pela contaminação do fluido amniótico, células placentárias ou sangue do cordão umbilical e, ainda, a possibilidade de auto-inoculação (Pannone et al. 2011; Grenman & Syrja 2012).

A teoria vírica proposta como estando na base do desenvolvimento do CCE é geradora de opiniões divergentes, sobretudo pelas inconsistências verificadas nos meios de detecção do vírus e delimitação das áreas anatómicas afectadas. No entanto, antes de se expor as inconsistências apontadas por alguns autores, é, antes de mais, relevante proceder à explanação de determinados parâmetros sobre o HPV (Bertolus et al. 2012; Bledsoe et al. 2013).

i. HPV

a) Estrutura do vírus e sua classificação

Actualmente reconhecem-se cerca de 150 tipos de HPV, 120 dos quais já se encontram totalmente sequenciados, e que estão divididos, de acordo com a sua afinidade para

locais específicos do epitélio, em mucosatrópicos (género *alfa*, afectando a mucosa da orofaringe e trato ano-genital) ou cutâneos (género *beta*, e que afecta a pele). De acordo com o seu potencial oncogénico os vírus mucosatrópicos podem ser classificados como “baixo” ou “alto” risco, sendo estes últimos encontrados, maioritariamente, em lesões pré-cancerosas ou cancerosas e incluem vários tipos, dos quais o 16 (85 a 90% dos casos) e 18 são os mais frequentemente encontrados. É importante referir que as estirpes de HPV de baixo risco também podem provocar lesões orais, lesões essas que incluem o papiloma das células escamosas, a verruga *vulgaris*, condiloma *acuminatum*, hiperplasia epitelial multifocal e a verruga oral. Estas lesões têm sido descritas em pacientes infetados por HPV como resultado de diversas anormalidades imunitárias (Rampias et al. 2013; Letian & Tianyu 2010; Krane 2013; Falaki et al. 2011). (Tabela 2)

Tabela 2. Tipos de HPV e classificação actual de acordo com capacidade de indução de malignidade

Baixo risco	Alto risco
6, 11, 42, 43, 44	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58
Lesões não malignas e lesões verrugosas benignas	Lesões pré cancerosas e cancerosas

(adaptado de Rautava & Syrjänen 2012)

O HPV, vírus não envelopados e com capacidade para infectar células epiteliais, apresentam cerca de 55nm de diâmetro e integram, segundo o *International Committee on the Taxonomy of Viruses*, uma família taxonómica distinta – a *Papillomaviridae*. A cápside, que envolve a pequena cadeia dupla de ADN circular que constitui o genoma viral e que possui cerca de 8000 pb e 8 fases de leitura aberta (ORF), é composta por duas proteínas virais codificadas, L1 e L2, sendo a primeira a mais importante e responsável pela ligação inicial à superfície celular. Importa ressaltar que os tipos, subtipos e variantes de HPV são estabelecidos de acordo com o grau de variabilidade na sequência do gene que codifica a proteína L1, num pequeno intervalo que pode ir de 2 a 10 %, já que este é o que apresenta um maior nível de conservação quando comparado

com os restantes. (Syrjänen et al. 2011; Rautava & Syrjänen 2012; Chung et al. 2013; Rampias et al. 2013).

O genoma do HPV codifica até dez tipos de proteínas e, de acordo com a função das mesmas, pode dividir-se em 3 áreas de comprimentos diferentes: uma região de 4000 pb responsável pela codificação de proteínas envolvidas na replicação do vírus e transformação celular; uma sequência de 3000 pb que codifica proteínas estruturais; e, por fim, uma região não codificante que contém elementos que regulam a replicação e transcrição (Rampias et al. 2013) (Figura 2).

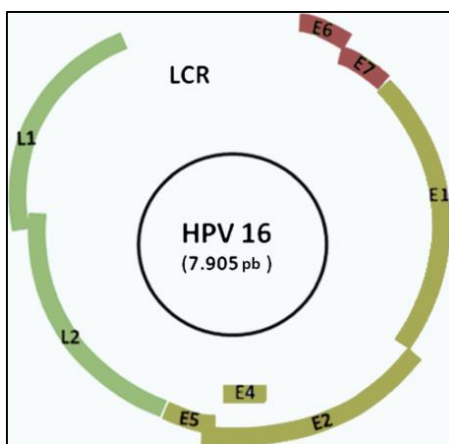


Figura 2. Organização do genoma do HPV. Proteínas E1 e E2 – funções reguladoras – E6 e E7 – funções de transformação celular; E4 – sem função conhecida; E5 – hidrofóbica, aumenta a imortalidade da célula; L1 e L2 – proteínas da cápside (adaptado de Abreu et al. 2012)

As sequências codificantes do genoma viral foram classificadas com base no programa de diferenciação da célula hospedeira, de modo que, a nível funcional, são identificadas como *early* ou precoces (E1, E2, E4, E5, E5, E6, E7), *late* ou tardias (L1 e L2) e, entre L1 e E6, ou seja, a montante das ORF's, existe a *long control region* ou região não codificante, como já mencionado, e que representa, por sua vez, a zona do genoma viral com maior grau de variabilidade (Figura 3). Entre as proteínas virais precoces é possível, ainda, fazer uma distinção em oncogénicas – E5, E6 e E7 – e não oncogénicas – E1, E2 e E4, sendo que a função da E3 e E8, encontradas em alguns tipos de HPV ainda permanece desconhecida (Horvath et al. 2010; Feller et al. 2010; Schiller et al. 2010; Syrjänen 2010).

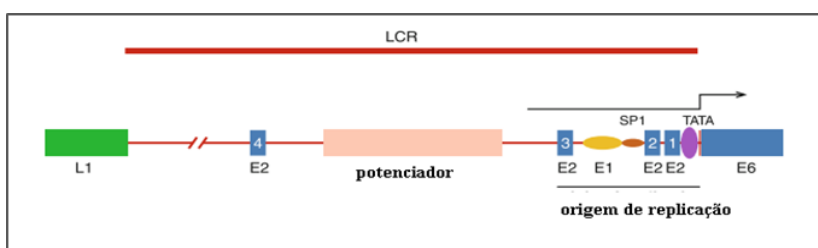


Figura 3. Região LCR ou não codificante do HPV (adaptado de Rautava & Syrjänen 2012)

As proteínas E1 e E2 estão implicadas na replicação do ADN viral, formando um complexo que se liga a sequências na origem de replicação do vírus e recrutando polimerases celulares e outras proteínas acessórias indispensáveis para a ocorrência deste evento. E1 e E2 são também responsáveis por manter o ADN do HPV na forma de epissoma durante a infecção inicial ou na fase de latência, na camada basal (Rampias et al. 2013).

As ORF's mais conservadas são as que codificam a E1, proteína oncogénica de aproximadamente 68kDa e com uma expressão em baixos níveis nas células infectadas pelo vírus. Esta proteína exibe actividade ATPase e helicase, reconhecendo sequências ricas em adenosina-timina (A-T) na origem da replicação do HPV, que estão próximas dos locais de iniciação da transcrição precoce (Rautava & Syrjänen 2012).

A proteína E2, por sua vez, também desempenha um papel importante na separação do genoma viral durante a divisão celular – ao ligar-se, simultaneamente, ao genoma e às proteínas associadas à cromatina, vai permitir a correcta segregação pelas células-filhas. De igual forma, tem também um papel regulador na expressão de E6 e E7, coordenando, assim a replicação viral. O papel da proteína E4 é a de facilitar o empacotamento do genoma, maturação das partículas virais, destruição dos filamentos de citoqueratina e interacção com o ARN (Chung & Gillison 2009; Vande Pol & Klingelhutz 2013; Yamakawa-kakuta et al. 2009)

Das designadas proteínas oncogénicas, a E6 e E7 são os elementos fundamentais no desenvolvimento do processo de carcinogénese ao suprimir os genes TP53 e RB1 cujos produtos são, respectivamente, a p53 e a pRB, o que conduz a defeitos na apoptose, nos mecanismos de reparação do ADN e na regulação do ciclo celular, e que, por fim, culmina na transformação maligna da célula. Mais especificamente, a proteína E6 conecta-se à p53 agindo como uma ubiquitina ligase, impedindo-a de exercer as seguintes funções: controlo da transição da fase G1 para a fase S, mediação da proliferação celular em resposta a estímulos mitogénicos, interrupção do ciclo celular na fase G1 perante erros no ADN e indução da apoptose quando existem danos no material genético que não podem ser reparados (Syrjänen 2010; Rautava & Syrjänen 2012; Francis et al. 2013; Angiero et al. 2013).

Por sua vez, a E7, ao conectar-se à pRb, impede que a sua função reguladora desta proteína seja exercida. A pRb, na sua forma não fosforilada, ao formar um complexo com o factor de transcrição E2F, impede o avanço do ciclo celular para a fase S, sempre que necessário. Na progressão para a fase S, as cinases dependentes de ciclinas (CDKs) fosforilam a pRb, levando à libertação de E2F, o que permite a transcrição de genes envolvidos na síntese de ADN e proliferação celular. A E7, por sua vez, conecta-se à forma não fosforilada da pRb, e interfere com a sua função de regulação do ciclo celular, condicionando a sua ligação ao factor de transcrição E2F, o que possibilita a activação constitutiva dos genes alvo envolvidos na progressão do ciclo celular. A proteína E7, nomeadamente a que se encontra presente nos tipos 16 e 18 (alto risco), exhibe, de igual forma, a capacidade de diminuir a expressão do complexo major de histocompatibilidade I (MHC I), interferindo com a apresentação de antígenos o que, por sua vez, resulta numa desregulação da resposta imunitária da célula, permitindo que o HPV persista nos tecidos afectados. A supressão da pRb pela E7 resulta na expressão aumentada da p16, um inibidor da cinase dependente de ciclina, podendo, segundo alguns autores, ser utilizada como biomarcador para tumores associados ao HPV (Francis et al. 2013; Yamakawa-kakuta et al. 2009; Mendelsohn et al. 2010).

A proteína E5, por sua vez, interage com os receptores dos factores de crescimento – EGFR, PDGFR e CSF-1R – e estimula a proliferação celular, inibindo, simultaneamente, a apoptose após lesão do ADN, desempenhando, aparentemente, um importante papel apenas na fase inicial da infecção. De facto, à medida que as lesões associadas a infecção por HPV progredem até cancro, o ADN viral é incorporado no genoma da célula hospedeira e uma parte substancial do material genético viral sofre deleção, incluindo a sequência codificadora da E5 (Feller et al. 2010; Rautava & Syrjänen 2012; Feller et al. 2013).

b) Ciclo de vida do HPV, mecanismo de infecção e transformação maligna celular

De uma forma geral, o ciclo de vida do HPV, complexo e dependente de factores de diferenciação expressos pelas várias camadas do epitélio, inicia-se perante uma infecção aguda num tecido sujeito a algum trauma ou abrasão. As células do epitélio, por sua vez, compreendem duas populações – “a progenitora” e em “maturação”. As primeiras têm a função de produzir células basais e conservar o potencial proliferativo do tecido, aumentando, através de divisões mitóticas, o número de células disponíveis para o processo subsequente; situam-se no estrato germinativo, na camada basal dos epitélios finos (pavimento da boca) e nas camadas mais profundas dos epitélios espessos (região jugal e palato). Uma porção de células que se deslocam para a superfície são, então, submetidas ao processo de maturação que, a nível da mucosa oral, segue a via da queratinização ou não-queratinização. O epitélio fino, não queratinizado, como o do pavimento da boca e face ventral da língua, renova mais rapidamente que o epitélio espesso queratinizado, como o do palato duro e gengiva, uma vez que a taxa de proliferação de queratinócitos basais é mais elevada no primeiro. O risco de ocorrerem mutações é, portanto, maior no epitélio não queratinizado (Feller et al. 2013; Paramio 2011).

As alterações que se verificam nos queratinócitos, à medida que progridem da camada basal para a superfície epitelial, fornecem um ambiente óptimo para uma replicação celular produtiva, responsável por transformá-los em células permissivas. Inicialmente o HPV infecta células basais indiferenciadas designadas por células-alvo que, por sua vez, possuem a maior capacidade de proliferação. Uma vez na célula-alvo, onde a presença e ligação ao receptor alfa-6 integrina é fundamental, o ADN viral é transportado para o núcleo onde será mantido sob a forma de epissoma – assim, o vírus é inicialmente conservado num número reduzido de cópias, não existindo descendência deste agente nas células. Após infecção das células escamosas pelos HPV de alto risco, o vírus pode comportar-se de duas formas – quando o genoma viral existe como epissoma, a expressão das oncoproteínas, nomeadamente E6 e E7, é restringida, não havendo transformação maligna; a proteína E2 reprime a replicação do ADN viral, bloqueando os factores de transcrição, e regula, juntamente com a E1, um número relativamente estável de cópias de genoma vírico que pode ir de 20 a 100, em cada célula basal. No entanto, quando a infecção se torna produtiva e o genoma do vírus é clivado na região

E2, consegue ser integrado no cromossoma da célula hospedeira e a sua função supressora sobre os genes é interrompida, conduzindo a uma expressão aumentada das oncoproteínas E6 e E7 que, como referido anteriormente, inactivam proteínas como a p53 e pRb, respectivamente, que são, por sua vez, supressoras de tumores. Importa sublinhar que neste aspecto o CCE assemelha-se ao carcinoma das células escamosas do colo do útero já que em ambos as proteínas supracitadas não são mutadas, mas sim inibidas. De facto, a repressão da proteína E6 permite uma recuperação da expressão da p53, o que apoia a informação referida (Rautava & Syrjänen 2012).

Ocorre, assim, a amplificação do genoma viral, em cerca de 1000 cópias, nos queratinócitos diferenciados e a expressão constitutiva de E6 e E7 terá como consequência a imortalização e proliferação celular, terminando na transformação maligna da célula. Através destes mecanismos, o HPV aumenta a probabilidade de sobrevivência das células, no sentido de facilitar o seu próprio ciclo de replicação e assegurar a sua descendência (Yuan et al. 2012).

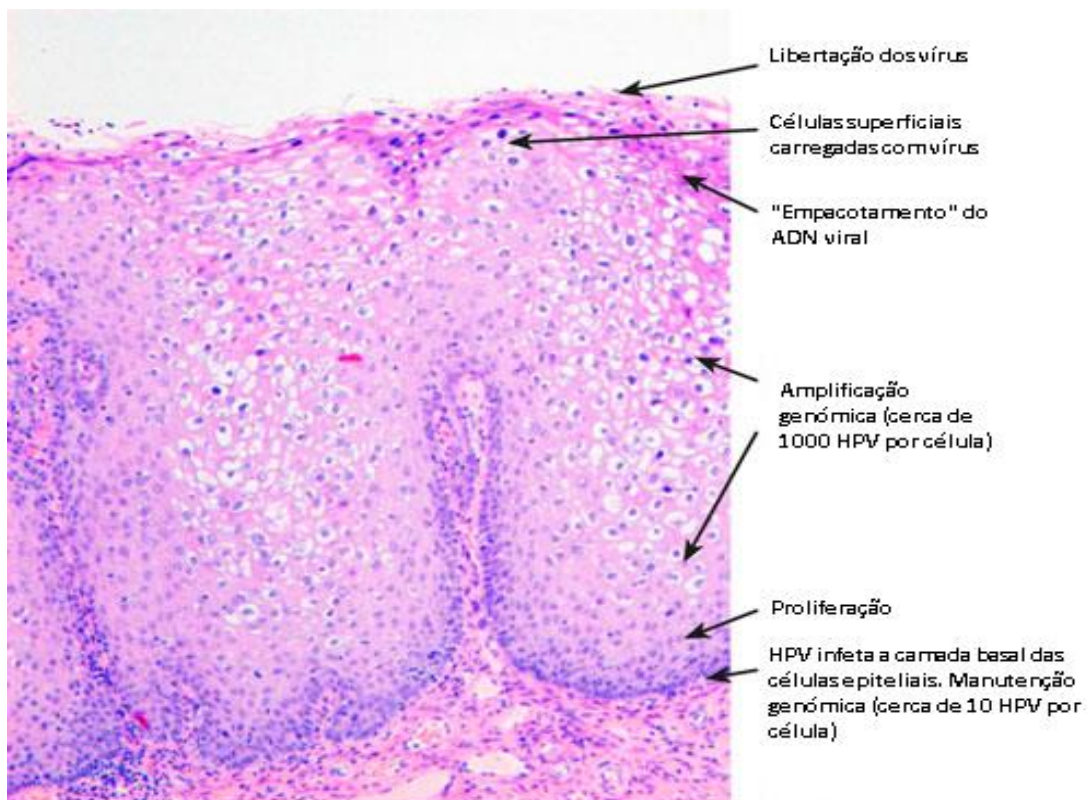


Figura 4. Ciclo do HPV e diferenciação epitelial (adaptado de Rautava & Syrjänen 2012)

Importa ressaltar que a E6, sozinha, não tem a capacidade de imortalizar os queratinócitos – o complexo E6-p53 requer uma proteína extra, a E6-AP, à qual se liga para, posteriormente, formar o complexo E6-E6-AP que se conecta à p53; nos HPV de baixo risco este evento também pode acontecer, contudo a ligação de E6-E6-AP à p53 não conduz à degradação desta última. No que concerne o gene E7, ao contrário do anteriormente descrito, possui a capacidade de, sozinho, imortalizar os queratinócitos, no entanto necessita de estar expresso em níveis elevados. De igual forma, nos HPV de baixo risco, a ligação à proteína Rb também se verifica, mas com menos afinidade, reforçando a diferença na transformação celular verificada entre estes dois tipos de vírus. Contudo, é importante referenciar que existe uma exceção já que a ligação E7-pRb do tipo HPV-1 é semelhante à encontrada na E7-pRb do tipo HPV-16. Esta evidência sugere que outros mecanismos, para além da formação do complexo supracitado, estão na base da indução de malignidade provocada por esta oncoproteína (Buck et al. 2013; Rothenberg & Ellisen 2012; Feller et al. 2013; Rautava & Syrjänen 2012).

De uma forma geral, os genes virais são, então, expressos de forma sequencial, ou seja, de genes precoces para genes tardios, seguindo o padrão de diferenciação do epitélio escamoso – inicia-se nas células basais e para-basais e progride para camadas epiteliais superiores – a par da formação completa do virião. O efeito citopático clássico que surge na infecção por HPV é a coilocitose, no entanto, também pode surgir, a nível histológico, a acantose, disqueratose e queratinócitos multinucleares (Miyahara et al. 2011).

Os eventos terminais do ciclo vital do vírus compreendem a expressão de E1-E4, a genes tardios L1 e L2 que irão permitir o evento subsequente de encapsidação do genoma, maturação e libertação de partículas virais (Stanley 2009).

A infecção persistente por HPV é o evento fundamental para que ocorra transformação celular. De uma forma geral, este agente vírico tem a capacidade de induzir infecções crónicas, desprovidas de sequelas sistémicas evidentes, o que indica que, de alguma forma, subverteu os mecanismos de defesa do hospedeiro, nomeadamente aqueles que pertencem à imunidade inata e adquirida. O ciclo do HPV e o facto de decorrer, exclusivamente, de forma intra-epitelial são pontos-chave para a compreensão da

estratégia adoptada por este agente para escapar à resposta imunitária. Primeiramente, a infecção viral não é acompanhada por inflamação, sendo que a ocorrência deste evento iria activar a imunidade inata; em acréscimo, o HPV não é um vírus lítico, mas sim lisogénico, e o seu ciclo vital ocorre em queratinócitos, havendo montagem e replicação viral naqueles que se encontram diferenciados e, portanto, que já terão sido submetidos, previamente, a um mecanismo regulatório e de apoptose. Outra característica do HPV que permite a sua evasão ao sistema imunitário do hospedeiro é o facto de só existir expressão viral dos genes e consecutivamente das oncoproteínas nos queratinócitos, ou seja, não há síntese de proteínas virais em células apresentadoras de antígenos. Por fim, mas não menos importante, o HPV provoca pouca ou nenhuma virémia – presença de vírus no sangue circulante – já que a inoculação deste agente acontece em interrupções epiteliais mas com a manutenção da integridade da camada basal, deixando, de igual forma, um acesso parco aos gânglios linfáticos. Assim, em acréscimo aos baixos níveis de resposta imune perante infecção por HPV, importa referir que o ambiente, estilo de vida, características genéticas do hospedeiro e do genoma viral podem influenciar a persistência do HPV e o desenvolvimento de patologias (Stanley 2009; Rautava & Syrjänen 2012).

c) Métodos laboratoriais de detecção e respectivas limitações

A ausência de sinais relativos à presença de CCE que permitam identificar a patologia num estágio precoce reforça a necessidade de se utilizar biomarcadores de elevada especificidade e sensibilidade em pacientes de alto risco, minimizando, assim, as taxas de morbidade e mortalidade (Goon et al. 2009).

Como os HPV não podem ser cultivados em tecidos ou animais de laboratório, quase todos os métodos actualmente utilizados para detecção do HPV, assentam na avaliação dos ácidos nucleicos virais, maioritariamente o ADN. No início, os testes de *Southern blot* e *Northern blot* constituíam métodos de eleição para a detecção de ADN e ARN, respectivamente, mas, o facto de requererem diversos materiais, serem morosos e apenas detectarem um tipo de HPV de cada vez, levou, a face a novos métodos que foram surgindo, ao seu progressivo abandono (Snijders et al. 2010; Poljak 2012).

Contudo, actualmente, não existe unanimidade no que concerne ao método mais adequado para a detecção desta entidade vírica nos CCE. A grande variação de valores obtidos é explicada por vários factores – as amostras, ou seja, como são obtidas e conservadas; a sensibilidade e especificidade dos métodos de teste e, não menos importante, os genótipos de HPV que são abarcados (Snijders et al. 2010; Poljak 2012; Syrjänen 2010).

De uma forma geral, os métodos empregues actualmente, podem ser divididos em “*target amplification*” – ou amplificação do alvo – e “*signal amplification*” – ou amplificação do sinal. De acordo com a metodologia adoptada pelo Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil do Porto, será descrito o protocolo de actuação perante uma lesão epitelial que utiliza, precisamente, um exemplo de cada dos tipos acima mencionados – *Polymerase Chain Reaction* (PCR) e captura híbrida.

Após a avaliação da lesão, existindo suspeita de malignidade, procede-se à biópsia incisional da mesma para avaliação do grau de alteração celular. Depois desta avaliação, e se existe suspeita de outros agentes biológicos causadores da lesão, nomeadamente HPV, a amostra é encaminhada para o Serviço de Virologia. Após a chegada da amostra de tecido fresco ou incluído em parafina, torna-se necessário proceder à extracção do seu material genético, no sentido de verificar a presença de ADN viral. Esta etapa é realizada através da utilização do *kit* comercial *Magna Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I*, da Roche, cujo princípio consiste na extracção e purificação de ácidos nucleicos (ADN e ARN) de forma automática, e em combinação com o equipamento *Magna Pure Compact*, a partir de fluídos corporais incluindo plasma, saliva, soro, líquido ascítico, sobrenadante de cultura de células, líquido cefalo-raquidiano, urina, etc.

O processo inicia-se com a clivagem da membrana celular e digestão, ligação das partículas magnéticas de vidro ao ADN, separação magnética do ADN juntamente com as partículas de vidro, remoção dos detritos celulares e separação do ADN das partículas de vidro (Protocolo de extracção de ADN do Serviço de Virologia do IPO do Porto elaborado pelo Dr. Hugo Sousa).

Após a extração do ADN procede-se à detecção do HPV através de um método específico que, nesta instituição, pode ser realizado por captura híbrida ou PCR, como mencionado anteriormente.

A captura híbrida consiste num ensaio de hibridização de ácidos nucleicos com amplificação do sinal por quimioluminescência aprovado pela FDA que utiliza a tecnologia de *Hybrid Capture 2*, comercializada pela Qiagen® e permite a detecção qualitativa, em microplacas, de ADN para a detecção de 13 tipos de HPV de alto-risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68) e 5 tipos de baixo risco (6, 11, 42, 43 e 44). As amostras que contêm o ADN alvo hibridizam com uma mistura específica de sondas de ARN para os tipos de HPV. Os híbridos ARN-ADN resultantes são capturados para a superfície do poço de uma microplaca revestida com anticorpos específicos antihíbridos ARN-ADN. Os híbridos imobilizados são depois detectados por um anticorpo conjugado com fosfatase alcalina. Este complexo vai, posteriormente, clivar o substrato adicionado e permitir a detecção por emissão de quimioluminescência. A cada híbrido capturado ligam-se vários anticorpos conjugados, o que resulta numa amplificação considerável do sinal, que é posteriormente detectada num luminómetro em Unidades Relativas de Luz (RLU). A intensidade indica a presença/ausência (daí o facto de ser apenas um teste qualitativo) de ADN de HPV na amostra (Luu et al. 2013; Abreu et al. 2012).

A técnica de PCR, por sua vez, utiliza polimerases do ácido nucleico, *primers*, e uma mistura de quatro desoxiribonucleótidos para amplificar uma sequência específica até níveis que possam ser facilmente lidos pelos vários sistemas disponíveis, utilizando, para tal, ciclos repetitivos com alterações de temperatura com o objectivo de provocar a desnaturação do material genético, ligação dos *primers* ao material genético e a sua consecutiva amplificação por uma ADN-polimerase termo-estável. De acordo com Syrjänen et al. (2011), a grande maioria das meta-análises refere a PCR como sendo o método padrão preferencial, ou *gold standard*, para detecção do HPV. Sendo uma técnica de amplificação, existe um consenso geral de que o gene a amplificar é o L1 uma vez que se trata do mais conservado (quando comparado com os restantes), permitindo identificar uma larga variedade de genótipos de HPV ao mesmo tempo. No entanto, os custos associados e o equipamento laboratorial e tecnológico que exige torna este método inviável para aplicação em larga escala. Ainda segundo este autor, a

hibridização *in situ*, pode ser um método mais sensível que o PCR em casos onde apenas algumas células da amostra contenham um elevado número de vírus que não sejam detectados por PCR (Syrjänen et al. 2011).

Nas amostras analisadas e cujos resultados sejam positivos para a presença do HPV procede-se, posteriormente, à sua genotipagem para saber qual o tipo de HPV e que se pode efectuar por PCR, utilizando a técnica de *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). Nesta técnica utiliza-se um fragmento de 450 pb amplificado pelos *primers* MY09/11 e tem sido avaliada como uma metodologia sensível para detectar e caracterizar o HPV em amostras clínicas, aliada ao facto de ser financeiramente vantajosa (Nobre et al. 2008).

Um método proposto para detecção de HPV de alto risco, mas ainda bastante polémico, tem sido através da detecção da expressão da proteína p16 por imunohistoquímica (IHQ). Como a p16 apresenta uma expressão aumentada após o fenómeno de integração do HPV de alto risco, a p16 IHC pode ser usada como um marcador substituto de outros métodos para identificar fenómeno do ciclo viral mencionado. Alguns autores apontam que este será um método mais vantajoso e atractivo pelo custo baixo, disponibilidade e facilidade de aplicação técnica quando comparado com os testes de captura híbrida e PCR (Duncan et al. 2013).

No entanto, outros autores referem que a análise IHQ da expressão da p16 carece de utilidade prognóstica no carcinoma das células escamosas orais se não for considerada a sua localização celular (citoplasmática ou nuclear). Isto deve ser tido em conta no que respeita o valor do prognóstico da IHQ da expressão da p16. Uma vez que a taxa de infecção por HPV se revelou ser baixa em carcinomas orais, a aplicação da expressão da p16 como marcador substituto da presença de HPV nestes carcinomas deve, portanto ser verificada em mais estudos (Gröbe et al. 2013).

Com a preocupação crescente no que diz respeito aos custos efectuados na área da saúde, torna-se inegável a necessidade de se desenvolver métodos standardizados, efectivos e económicos para a detecção do HPV no CCE, para que, simultaneamente, haja aplicabilidade dos mesmos nas populações com poucos recursos. O desenvolvimento de uma forma de detecção uniforme e o estabelecimento de critérios

de validação baseados em parâmetros internacionais homogêneos torna-se premente para colmatar as falhas nas taxas díspares obtidas pela maioria dos estudos efectuados até ao momento. De uma forma geral, a investigação dos mecanismos e correspondentes biomarcadores associados ao desenvolvimento e progressão neoplásica no CCE continua a ser uma importante prioridade.

d) Manifestações histológicas da infecção por HPV e prognóstico do CCE HPV-positivo

De uma forma geral, os CCE HPV-positivos têm um perfil molecular diferente quando comparados com os CCE HPV-negativos e, em acréscimo, os primeiros apresentam diversas semelhanças com a patologia oncológica que se desenvolve nas células escamosas do útero. As manifestações clínicas e características microscópicas de lesões associadas ao HPV variam com o local anatómico afectado e com o genótipo deste vírus. Tendo como base as alterações celulares e a histopatologia, a infecção por HPV é caracterizada, classicamente, pela presença de coilócitos (Figura 5) que, por sua vez, representam células com halos citoplasmáticos perinucleares, displasia nuclear, metaplasia imatura atípica e binucleação. Importa ressaltar que o diagnóstico do HPV incide também, noutras alterações histopatológicas que são características da acção deste agente vírico, nomeadamente a disqueratose, papilomatose, hiperqueratose, acantose e paraqueratose (Chaudhary et al. 2009; Miyahara et al. 2011).

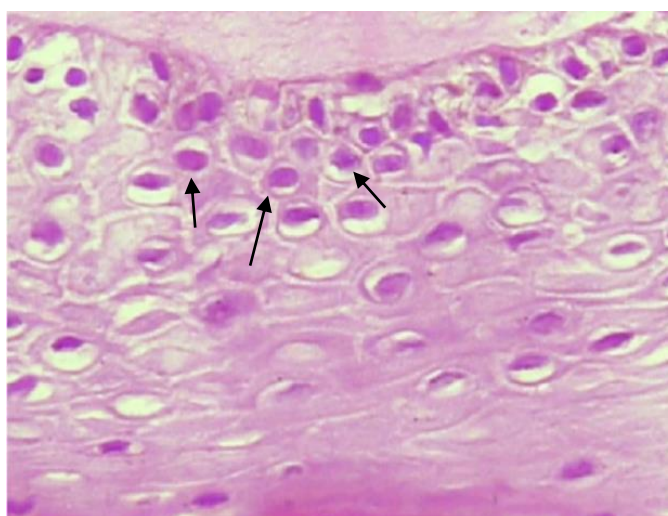


Figura 5. Camada de epitélio escamoso demonstrando coilocitose (setas), (adaptado de Chaudhary et al. 2009)

Alguns estudos apontam, de facto, que os aspectos mais comuns na detecção da infecção por HPV, no cérvix do útero, são a presença de coilocitose (88.89%) e binucleação (75%). Contudo, importa ressaltar, que a prevalência de HPV na cavidade oral varia, dependendo do método de detecção e localização da lesão (Figura 6) e que, apesar da coilocitose ser um importante marcador morfológico da acção deste vírus, não se constitui numa base precisa e única para diagnosticar a infecção por HPV, já que de acordo com Miyahara et al. (2011), num estudo recente, este pressuposto resultou em cerca de 30% de falsos positivos. A identificação de disqueratose que, na maioria das vezes, ocorre juntamente com a coilocitose, é o segundo efeito citopático mais sugestivo de infecção por HPV e também deve ser tido em conta. Em associação com as alterações histológicas, é importante associar os anteriormente referidos testes moleculares (Miyahara et al. 2011).

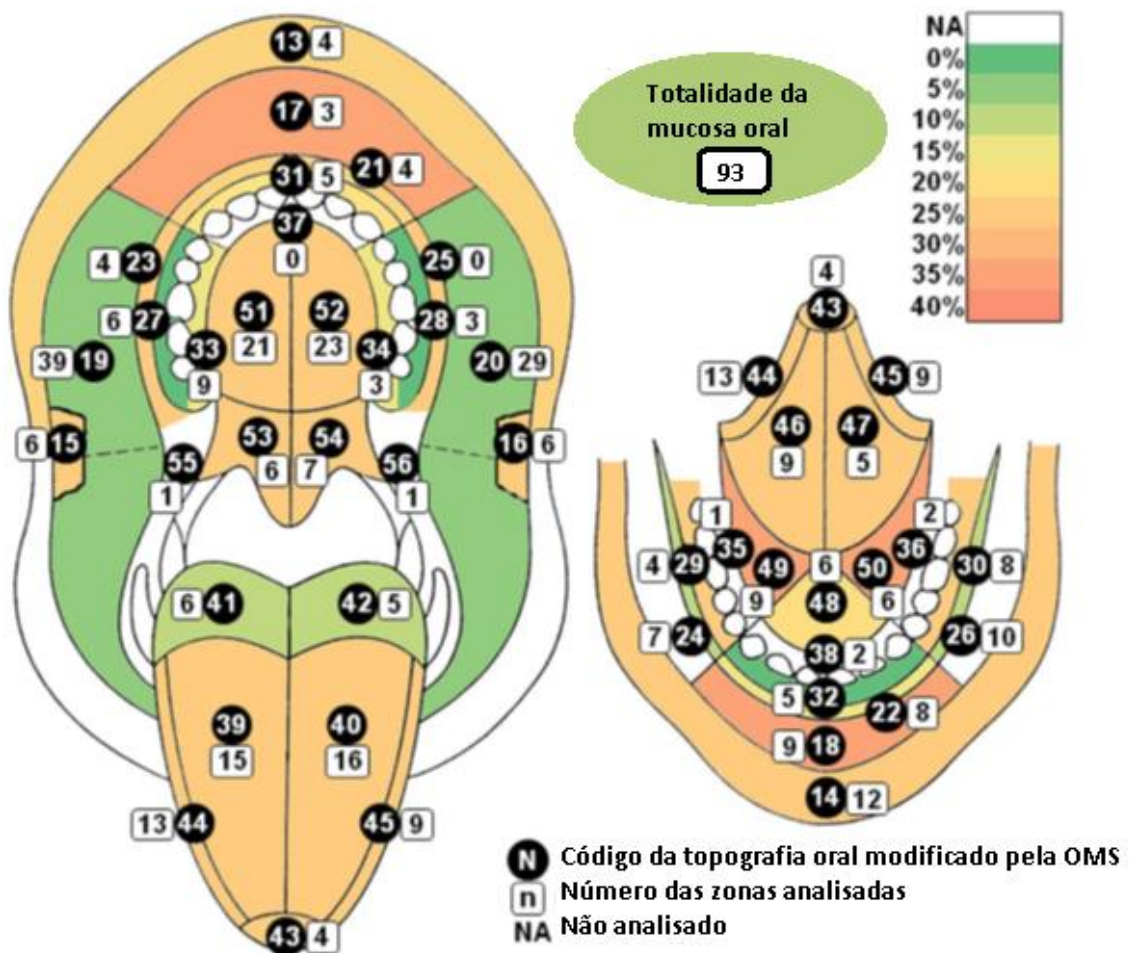


Figura 6. Frequência de detecção do HPV em diferentes regiões da mucosa oral. A topografia da mucosa oral está codificada de acordo com a topografia modificada da OMS (Roed-Peterson and Roenstrup) [12,22]: bordo do vermelhão superior - (13) e inferior (14), comissuras labiais –

direita (15) e esquerda (16), mucosa labial – superior (17) e inferior (18), sulco labial – superior (21) e inferior (22), mucosa bucal – direita (19) e esquerda (20), sulco bucal – direito superior (23) e direito inferior (24), esquerdo superior (25) e esquerdo inferior (26), gengiva superior ou crista alveolar edêntula por vestibular – direita (27) e esquerda (28), gengiva inferior ou crista alveolar edêntula – direita (29) e esquerda (30), gengiva superior anterior e crista edêntula por vestibular (31), gengiva inferior anterior e crista edêntula por vestibular (32), gengiva superior posterior ou crista alveolar por palatino – direita (33) e esquerda (34), gengiva inferior posterior ou crista alveolar por lingual – direita (35) e esquerda (36), gengiva anterior ou crista edêntula – por palatino (37) e por lingual (38), dorso da língua – direita (39) e esquerda (40), base da língua – direita (41) e esquerda (42), ponta da língua (43), margem da língua – direita (44) e esquerda (45), superfície da língua – direita (46) e esquerda (47), pavimento frontal da boca (48), pavimento lateral da boca – direita (49) e esquerda (50), palato duro – direita (51) e esquerda (52), palato mole – direita (53) e esquerda (54), zona das amígdalas anterior – direita (55) e esquerda (56). A escala de cores indica a frequência de HPV positivo nas respectivas localizações; para regiões com menos de três amostras analisadas, a frequência não foi calculada; regiões simétricas foram contadas como uma para a análise. (adaptado de (Mravak-Stipetić et al. 2013)

As lesões pré-malignas de cabeça e pescoço associadas ao HPV estão pobremente caracterizadas. A maioria dos CCE invasivos relacionadas com o HPV surgem preferencialmente nas criptas das amígdalas relativamente à superfície epitelial, fazendo assim com que a “displasia de cripta” seja um precursor destes tumores. A alta associação do HPV ao carcinoma da amígdala ainda não está completamente explicada. Ao contrário da mucosa uterina e do canal anal, as mucosas das amígdalas não têm uma junção escamosa glandular que facilite o acesso das partículas virais às células basais do epitélio. No entanto, a mucosa das amígdalas possui invaginações epiteliais profundas que criam uma extensa e fina superfície epitelial que permite o acesso de antigénios ao tecido linfóide subjacente, induzindo assim uma resposta imunitária. De facto, estudos de microscopia eletrónica têm demonstrado que o epitélio reticulado da cripta da amígdala contém, por si só, inúmeros pequenos vasos sanguíneos e tem uma descontinuidade na base da membrana. Deste modo, pode ocorrer invasão ou mesmo metástases em estágios muito primários do desenvolvimento tumoral, mesmo em lesões que aparecem histologicamente *in situ*. Não é incomum ocorrências clínicas de tumores extremamente pequenos e em fases precoces T1 estarem associados a metástases nos gânglios regionais do pescoço. Por estas razões, alguns consideram todas as neoplasias induzida por HPV das criptas das amígdalas como potencialmente malignas, independentemente de haver ou não um corte histológico de evidência de invasão estromal (Chernock et al. 2013; Charfi et al. 2008).

Os indivíduos com CCE HPV-positivos tendem a ser caucasianos, jovens e com uma cumulativa exposição ao vírus através de comportamentos sexuais. O aumento da prevalência das infecções por HPV pode, de facto, segundo vários autores, ocorrer pela tendência crescente de aceitação de certas condutas, tais como prática de sexo oral, entre adolescentes e adultos jovens (Chaudhary et al. 2009; Benson et al. 2013). Na tabela 3 é feita uma análise comparativa dos cancros HPV-positivos com HPV-negativos.

Tabela 3. Diferenças entre o cancro orofaríngeo HPV-Positivo e HPV-Negativo

	HPV-Positivos	HPV-Negativos
Idade	Indivíduos mais novos (30-50)	Indivíduos mais velhos (50-70)
Factores de risco	Sexo oral, <i>french kiss</i> , elevado número de parceiros sexuais, histórico de IST	Longo histórico de consumo de tabaco e/ou álcool
Incidência	A aumentar	A diminuir
Localização	Base da língua, amígdalas	Mucosa Oral
Cancerização de campo	Não	Sim
Histologia	Fracamente diferenciado	Claramente diferenciado
Estágio de diagnóstico	T3-4; N2-3	Variável
Biomarcadores	Sobre-expressão da p16, Inactivação da p16 e pRb	Perda da p16, Mutação do P53 e do PRb; ciclina-D1; EGFR e sobre expressão de survivina (ou gene BIRC5)
Mutações cromossómica	Pouco frequentes	Frequentes
Prognóstico	Muito bom, sensibilidade aumentada à radioterapia e quimioterapia	Mau
Metástases à distância	Raro	Frequente
Reincidência	Raro	Frequente
Sobrevivência a cinco anos	60%-90%	20-70%

Os carcinomas das células escamosas orais induzidos por HPV são tumores únicos e a sua distinção dos HPV-negativos tem significância clínica uma vez que já muitos estudos feitos têm estabelecido que o prognóstico dos primeiros é mais favorável, assim

como a sobrevivência dos indivíduos, facto este que estará relacionado com a sua estabilidade local e radiosensibilidade. Num estudo feito por Mendelsohn et al (2010), é demonstrado que a expressão aumentada da p16 associada à infecção por HPV está relacionada com tumores pouco diferenciados assim com tumores basais de células escamosas. Tanto com o HPV como com a p16, não houve aumento do grau de invasão tanto perineural como perivascular, o que pode parcialmente explicar que estes tumores aparentemente tenham um prognóstico mais favorável (Mendelsohn et al. 2010).

Deste modo, alguns investigadores têm sugerido que este grupo de pacientes pode beneficiar de regimes de tratamento menos agressivos ao nível da toxicidade. No estudo realizado por Kaka et al. (2013), foram escolhidos dois biomarcadores para investigação: a expressão da p53 – que se mostrou estar relacionada com a sobrevivência – e o NOTCH1 – uma via sinalizadora que tem sido estudada em tumores HPV-Positivos e que tem a capacidade de reprimir a expressão das proteínas E6 e E7, limitando deste modo a carcinogénese. Nos tumores com alta expressão de NOTCH1, tem sido relacionada uma agressividade tumoral menor, reforçando o melhor prognóstico destes pacientes (Duncan et al. 2013; Kaka et al. 2013).

Fakhry et al. (2008) conduziram um dos primeiros estudos sobre a resposta dos pacientes com CCE HPV-Positivo ao tratamento e sua sobrevivência, no qual confirmou que estes pacientes tinham um prognóstico mais favorável e assim como maior sensibilidade ao tratamento de quimioterapia e radioterapia. Também verificaram que havia maior probabilidade de um tumor HPV-positivo surgir na orofaringe que um tumor HPV-negativo, sendo o primeiro fracamente diferenciado. Adicionalmente, pacientes com tumores HPV-positivos tinham menor exposição ao tabaco, providenciando assim evidências de que estes tumores têm uma identidade clínica distinta dos HPV-Negativos (Fakhry et al. 2008).

Outras diferenças encontradas entre CCE HPV-positivo e CCE HPV-negativo prende-se com as alterações cromossómicas, já que o primeiro, fundamentalmente o que deriva do tipo HPV-16 é caracterizado por perdas cromossómicas ocasionais, enquanto que o CCE não induzido por HPV é caracterizado por grosseiras deleções que envolvem grandes partes de braços cromossómicos e que ocorrem numa fase mais precoce do processo de cancerização (Chaudhary et al. 2009).

e) Implicações clínicas da infecção por HPV

Os cancros da orofaringe são menos visíveis e mais susceptíveis de serem detectados em estádios mais tardios que aqueles da cavidade oral. Adicionalmente, o cancro da orofaringe pode partilhar sintomas – tais como garganta inchada, dores de ouvidos, inflamação dos gânglios linfáticos e rouquidão – com condições benignas tais como a faringite e a amigdalite. Assim, os profissionais de saúde deverão estar atentos não só às indicações dos pacientes, orais ou escritas, mas também a outros sintomas como disfagia hemoptise e perda de peso inexplicada. Deverão ser precisos no exame oral e intra-oral incluindo as cadeias ganglionares durante a consulta médica. O médico dentista deverá ainda fazer um *follow up* de qualquer paciente que apresente sinais e sintomas persistentes de doença na orofaringe. Mais informação sobre a história natural da infecção por HPV deve ser obtida para que o profissional de saúde possa determinar potenciais intervenções que diminuam a incidência do CCE. Os dentistas devem encorajar a cessação de hábitos prejudiciais, nomeadamente o consumo de tabaco e álcool, ao mesmo tempo que deve estar consciente de que a patologia oncológica que afeta as amígdalas e a base da língua afeta um grupo populacional mais jovem e sem os fatores de risco tradicionais (Cleveland et al. 2013).

ii) Inconsistências na associação do HPV ao CCE

A pesquisa por uma causa infecciosa que pudesse explicar os cerca de 15 a 20% de indivíduos acometidos por patologia oncológica oral, sem os factores de risco clássicos e com características demográficas diferentes, representaria um avanço impressionante na medicina e numa melhoria inegável das elevadas taxas de mortalidade e morbidade associadas ao cancro. Pelas características e semelhanças já mencionadas, o CCE foi fortemente associado ao HPV, especialmente aos de alto risco. Contudo, artigos recentes apontam que os resultados obtidos pela maioria dos estudos apresentam valores de ADN viral numa variação que pode ir dos 0% ao 100% já que, segundo estes autores, os testes e o protocolo de aplicação dos mesmos possuíam características diferentes e algumas inconsistências. Mais especificamente, a prevalência de HPV nas biópsias de CCE eram sempre inferiores quando era utilizada a Hibridização *in situ* (HIS) (9-24%) e

Southern Blotting (5-28%), de baixa sensibilidade, quando comparado com a PCR (10-74%) que, por sua vez, possui elevada sensibilidade – traduzindo, assim, resultados incoerentes quanto à efectiva contribuição do HPV. De igual forma, a controvérsia nos métodos de detecção passa pelo local anatómico escolhido e método de obtenção das amostras que pode ser feita através de biópsias, esfregaços, bochechos, etc. e procedimentos de armazenamento que, por sua vez, inclui conservação de amostras frescas pelo frio (congelamento) ou fixadas em formalina e, posteriormente, incluídas em parafina. O tipo de espécime obtido também é importante já que, usando a técnica de PCR, a prevalência de HPV em células exfoliadas é bastante baixa (0-22%) quando comparada com a que é obtida directamente de tecidos (Goon et al. 2009; Krane 2013; Huang et al. 2012; Adamopoulou et al. 2008). A ausência de um método universal ou um protocolo *standard* conduz, desta forma, a confusões e viés neste campo. Nenhum marcador mostrou fidedignidade em identificar, universalmente, o CCE e respectiva agressividade pelo que os dados obtidos até agora sobre a prevalência de HPV nos CCE são bastante variáveis (Sahebamee et al. 2009).

Outros autores referem ainda que, anatomicamente, os estudos não foram precisos, havendo confusão quanto aos termos “cavidade oral” e “orofaringe” ou seja, na delimitação precisa das áreas – as amígdalas e a base da língua eram incluídas na cavidade oral e não na orofaringe, e as diferenças histológicas inerentes a cada área não eram consideradas, mas sim perspectivadas como iguais. Alguns artigos referem que estas imprecisões são fundamentais para classificar como sobrestimada a associação entre este vírus e o cancro oral (Bertolus et al. 2012).

III. Conclusão

O HPV tem surgido como uma entidade vírica associada ao CCE, especialmente na oncologia da orofaringe, particularmente nas amígdalas. Cerca de 15 a 20% dos indivíduos surgem com características diferentes das estudadas até então, ou seja, ocupando um grupo etário mais jovem e desprovido dos factores de risco clássicos. O fenómeno verificado recentemente, ou seja, de decréscimo do cancro da cabeça e pescoço em geral, e aumento da incidência de CCE nas áreas anatómicas supracitadas, torna premente a investigação da efectividade deste vírus no processo da carcinogénese.

De facto, os mecanismos moleculares deste agente têm demonstrado a capacidade de interromper a actividade de elementos celulares fundamentais para a regulação da divisão celular e morte celular programada.

A persistência de infecções provocadas pelo HPV na mucosa oral pode aumentar o risco de desenvolver cancro oral, por isso, um exame clínico regular e metuculoso é a ferramenta mais importante na deteção de lesões orais, tendo em conta os sinais patognómicos deste vírus. Sabe-se que em doentes imunocomprometidos se deverá ter uma atenção redobrada e uma pesquisa mais frequente quanto à presença de lesões da orofaringe e amígdalas deve ser realizada, já que um dos mecanismos de acção do vírus é a tentativa de escape à imunidade inata e adquirida. Estes indivíduos, estando mais susceptíveis, poderão ter lesões que mais facilmente progridam para a malignidade.

De igual forma, o profissional de saúde, tendo conhecimento sobre os factores de risco e características dos cancros HPV-Positivo e HPV-Negativo, estará mais apto para precocemente detectar e diagnosticar lesões, sejam elas de teor benigno, pré-maligno ou maligno, assim como terá um corpo de conhecimentos que lhe permitirá proceder ao encorajamento dos pacientes no sentido de evitar hábitos prejudiciais.

No sentido de enfrentar os cancros causados por HPV é absolutamente fundamental que certas inconsistências na sua investigação sejam eliminadas. É premente adoptar métodos mais rigorosos e estabelecer um consenso na terminologia adoptada. De igual

forma, é importante deslindar ainda diversos aspectos do ciclo vital do HPV e perceber, de forma mais aprofundada, certos mecanismos moleculares indutores da oncogénese.

Bibliografia

- Abreu, A.L.P. et al., 2012. A review of methods for detect human Papillomavirus infection. *Virology Journal*, 9(1), p.262. Available at: <http://www.virologyj.com/content/9/1/262> [Accessed October 23, 2013].
- Adamopoulou, M. et al., 2008. HPV Detection Rate in Saliva May Depend. , 602, pp.599–602.
- Alberts, B. et al., 2004. *Biologia Molecular da Célula* 4th ed. Artmed, ed., Porto Alegre.
- Angiero, F., Buccianti, A. & Parma, L., 2013. Human papilloma virus lesions of the oral cavity : healing and relapse after treatment with 810 – 980 nm diode laser.
- Benson, E. et al., 2013. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral oncology*, pp.24–28. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24134947> [Accessed October 22, 2013].
- Bertolus, C. et al., 2012. Clinical relevance of systematic human papillomavirus (HPV) diagnosis in oral squamous cell carcinoma. *Infectious agents and cancer*, 7(1), p.13. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3406976&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 14, 2013].
- Bledsoe, T.J. et al., 2013. Oropharyngeal squamous cell carcinoma with known human papillomavirus status treated with definitive chemoradiotherapy: patterns of failure and toxicity outcomes. *Radiation oncology (London, England)*, 8(1), p.174. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3718699&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 24, 2013].
- Buck, C.B., Day, P.M. & Trus, B.L., 2013. The papillomavirus major capsid protein L1. *Virology*, pp.1–6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23800545> [Accessed September 3, 2013].
- Cardesa, A. & Nadal, A., 2011. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. *Acta dermatovenerologica Alpina, Panonica, et Adriatica*, 20(3), pp.161–73. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22131117>.
- Charfi, L. et al., 2008. Two types of squamous cell carcinoma of the palatine tonsil characterized by distinct etiology, molecular features and outcome. *Cancer letters*, 260(1-2), pp.72–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18060686> [Accessed September 29, 2013].
- Chaudhary, A.K. et al., 2009. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions : updated review.

- Chernock, R.D. et al., 2013. Extensive HPV-Related Carcinoma In Situ of the Upper Aerodigestive Tract with “Nonkeratinizing” Histologic Features. *Head and neck pathology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24151062> [Accessed October 29, 2013].
- Chung, C.H., Bagheri, A. & D’Souza, G., 2013. Epidemiology of oral human papillomavirus infection. *Oral oncology*, pp.6–11. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080455> [Accessed October 17, 2013].
- Chung, C.H. & Gillison, M.L., 2009. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(22), pp.6758–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19861444> [Accessed August 6, 2013].
- Cleveland, J.L. et al., 2013. Updated information and services including high-resolution figures, can be found in the online version of this article at:
- D’Souza, G. & Dempsey, A., 2011. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Preventive medicine*, 53 Suppl 1, pp.S5–S11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3287051&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 2, 2013].
- Duncan, L.D. et al., 2013. P16 Immunohistochemistry Can Be Used To Detect Human Papillomavirus in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 71(8), pp.1367–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23642549> [Accessed October 23, 2013].
- Duray, A. et al., 2012. Human papillomavirus DNA strongly correlates with a poorer prognosis in oral cavity carcinoma. *The Laryngoscope*, 122(7), pp.1558–65. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22532307> [Accessed July 21, 2013].
- Fakhry, C. et al., 2008. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 100(4), pp.261–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18270337> [Accessed October 30, 2013].
- Falaki, F. et al., 2011. Clinical and histopathological analysis of oral Squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: A retrospective study and review of literature. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 16(4), pp.e473–e477. Available at: http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv16_i4_p473.pdf [Accessed October 29, 2013].
- Feller, L. et al., 2010. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 1: human papillomavirus-mediated carcinogenesis. *Head & face medicine*, 6, p.14. Available at:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2917403&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Feller, L., Kramer, B. & Lemmer, J., 2012. Pathobiology of cancer metastasis: a short account. *Cancer cell international*, 12(1), p.24. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3407798&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 12, 2013].
- Feller, L.L. et al., 2013. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer cell international*, 13(1), p.31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3626548&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 22, 2013].
- Francis, G. et al., 2013. Accumulation of inactive p53 protein in oral squamous cell carcinoma: stabilization by protein interaction. *European journal of oral sciences*, 121(1), pp.21–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23331420> [Accessed July 22, 2013].
- Goon, P.K.C. et al., 2009. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head & neck oncology*, 1, p.36. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2770444&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 6, 2013].
- Grenman, S. & Syrja, S., 2012. Oral Mucosa as a Reservoir of Human Papillomavirus : Point Prevalence , Genotype Distribution , and Incident Infections Among Males in a 7-year Prospective Study. , 62, pp.1063–1070.
- Gröbe, A. et al., 2013. Immunohistochemical analysis of p16 expression, HPV infection and its prognostic utility in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 42(9), pp.676–81. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23721566> [Accessed October 30, 2013].
- Horvath, C. a J. et al., 2010. Mechanisms of cell entry by human papillomaviruses: an overview. *Virology journal*, 7, p.11. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2823669&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Huang, S.F. et al., 2012. Association of HPV infections with second primary tumors in early-staged oral cavity cancer. *Oral diseases*, 18(8), pp.809–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747969> [Accessed August 6, 2013].
- Jayam, R., 2010. Oral Field Cancerization : A Review. , 22(December), pp.201–205.
- Junqueira, L.C. & Carneiro, J., 2004. *Histologia Básica* 10th ed., Guanabara Koogan.
- Kaka, A.S. et al., 2013. Highly aggressive human papillomavirus-related oropharyngeal cancer : clinical , radiologic , and pathologic characteristics. *Oral Surgery, Oral*

- Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 116(3), pp.327–335. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2013.04.011>.
- Khalili, J., 2008. Oral cancer: risk factors, prevention and diagnostic. *Experimental oncology*, 30(4), pp.259–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19112421>.
- Krane, J.F., 2013. Role of cytology in the diagnosis and management of HPV-associated head and neck carcinoma. *Acta cytologica*, 57(2), pp.117–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23406782> [Accessed October 26, 2013].
- Larsen, S.R. et al., 2009. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, 38(8), pp.657–62. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19563504> [Accessed July 27, 2013].
- Lee, L.-A. et al., 2013. Increasing rates of low-risk human papillomavirus infections in patients with oral cavity squamous cell carcinoma: Association with clinical outcomes. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 57(4), pp.331–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669598> [Accessed July 14, 2013].
- Letian, T. & Tianyu, Z., 2010. Cellular receptor binding and entry of human papillomavirus. *Virology journal*, 7, p.2. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2820467&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Luu, H.N. et al., 2013. Comparing the Performance of Hybrid Capture II and Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Identification of Cervical Dysplasia in the Screening and Diagnostic Settings. *Clinical Medicine Insights. Oncology*, 7, pp.247–55. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3795532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 26, 2013].
- Martin-Hernan, F. et al., 2013. Oral cancer, HPV infection and evidence of sexual transmission. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 18(3), pp.e439–e444. Available at: http://www.medicinaoral.com/pubmed/medoralv18_i3_p439.pdf [Accessed June 23, 2013].
- Mendelsohn, A.H. et al., 2010. Histopathologic findings of HPV and p16 positive HNSCC. *The Laryngoscope*, 120(9), pp.1788–94. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20803740> [Accessed August 6, 2013].
- Miyahara, G.I. et al., 2011. Correlation between koilocytes and human papillomavirus detection by PCR in oral and oropharynx squamous cell carcinoma biopsies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106(2), pp.166–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21537675>.

- Mravak-Stipetić, M. et al., 2013. Human papillomavirus in the lesions of the oral mucosa according to topography. *PloS one*, 8(7), p.e69736. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3726768&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 23, 2013].
- Nobre, R.J., de Almeida, L.P. & Martins, T.C., 2008. Complete genotyping of mucosal human papillomavirus using a restriction fragment length polymorphism analysis and an original typing algorithm. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 42(1), pp.13–21. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304866> [Accessed October 26, 2013].
- Noguti, J. et al., 2012. Metastasis from oral cancer: an overview. *Cancer genomics & proteomics*, 9(5), pp.329–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22990112>.
- O’Rorke, M. a et al., 2012. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral oncology*, 48(12), pp.1191–201. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22841677> [Accessed June 2, 2013].
- Pannone, G. et al., 2011. The role of human papillomavirus in the pathogenesis of head & neck squamous cell carcinoma: an overview. *Infectious agents and cancer*, 6(1), p.4. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3072321&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 16, 2013].
- Paramio, J.M., 2011. Cancer Initiating Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.
- Vande Pol, S.B. & Klingelhutz, A.J., 2013. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, pp.1–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23711382> [Accessed September 3, 2013].
- Poljak, M., 2012. Prophylactic human papillomavirus vaccination and primary prevention of cervical cancer : issues and challenges.
- Prabhu, S.R. & Wilson, D.F., 2013. Human papillomavirus and oral disease - emerging evidence: a review. *Australian dental journal*, 58(1), pp.2–10; quiz 125. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23441786> [Accessed June 2, 2013].
- Rampias, T., Sasaki, C. & Psyri, A., 2013. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral oncology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23953776> [Accessed October 23, 2013].
- Rautava, J. & Syrjänen, S., 2012. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head and neck pathology*, 6 Suppl 1, pp.S3–15. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782219> [Accessed June 5, 2013].

- Rothenberg, S.M. & Ellisen, L.W., 2012. Science in medicine The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. , 122(6), pp.1951–1957.
- SÁ, A.A.D.M.E., 2008. *INCIDÊNCIA, MORTALIDADE E SOBREVIVÊNCIA DOS CARCINOMAS ORAIS NO DISTRITO DE VIANA DO CASTELO*. Universidade do Porto.
- Sahebamee, M. et al., 2009. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*, 14(10), pp.e525–e528. Available at: <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v14i10/medoralv14i10pe525.pdf> [Accessed October 31, 2013].
- Santos, L.L. & Teixeira, L.M., 2011. *Oncologia Oral* 1ª ed. Lidel, ed., Lisboa.
- Schiller, J.T., Day, P.M. & Kines, R.C., 2010. Current understanding of the mechanism of HPV infection. *Gynecologic oncology*, 118(1 Suppl), pp.S12–7. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3493113&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 30, 2013].
- Silveira, A. et al., 2012. Oncologia de Cabeça e Pescoço: enquadramento epidemiológico e clínico na avaliação da Qualidade de Vida Relacionada com a Saúde Head and Neck Cancer: Health Related Quality of Life Assessment epidemiological perspectives. , 15(1), pp.38–48.
- Snijders, P.J.F., Heideman, D. a M. & Meijer, C.J.L.M., 2010. Methods for HPV detection in exfoliated cell and tissue specimens. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 118(6-7), pp.520–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20553532> [Accessed October 31, 2013].
- Stanley, M. a, 2009. Immune responses to human papilloma viruses. *The Indian journal of medical research*, 130(3), pp.266–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19901436>.
- Syrjänen, S. et al., 2011. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. *Oral diseases*, 17 Suppl 1(January), pp.58–72. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21382139> [Accessed May 29, 2013].
- Syrjänen, S., 2010. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 21 Suppl 7(Supplement 7), pp.vii243–5. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943622> [Accessed June 24, 2013].
- Tanaka, Takuji, Tanaka, M. & Tanaka, Takahiro, 2011. Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. *Pathology research international*, 2011, p.431246. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3108384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed May 29, 2013].

- Vargas-Ferreira, F. et al., 2012. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. *Brazilian dental journal*, 23(5), pp.586–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23306239>.
- Wittekindt, C. et al., 2012. Basics of tumor development and importance of human papilloma virus (HPV) for head and neck cancer. *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery*, 11, p.Doc09. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3544207&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yamakawa-kakuta, Y. et al., 2009. Does the expression of HPV16 / 18 E6 / E7 in head and neck squamous cell carcinomas relate to their clinicopathological characteristics ? , pp.983–988.
- Yuan, C.-H., Filippova, M. & Duerksen-Hughes, P., 2012. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. *Viruses*, 4(12), pp.3831–50. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3528293&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 29, 2013].
- Zengel, P. et al., 2012. Cancer of unknown primary originating from oropharyngeal carcinomas are strongly correlated to HPV positivity. *Virchows Archiv: an international journal of pathology*, 461(3), pp.283–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22855133> [Accessed July 21, 2013].