

RESSALVA

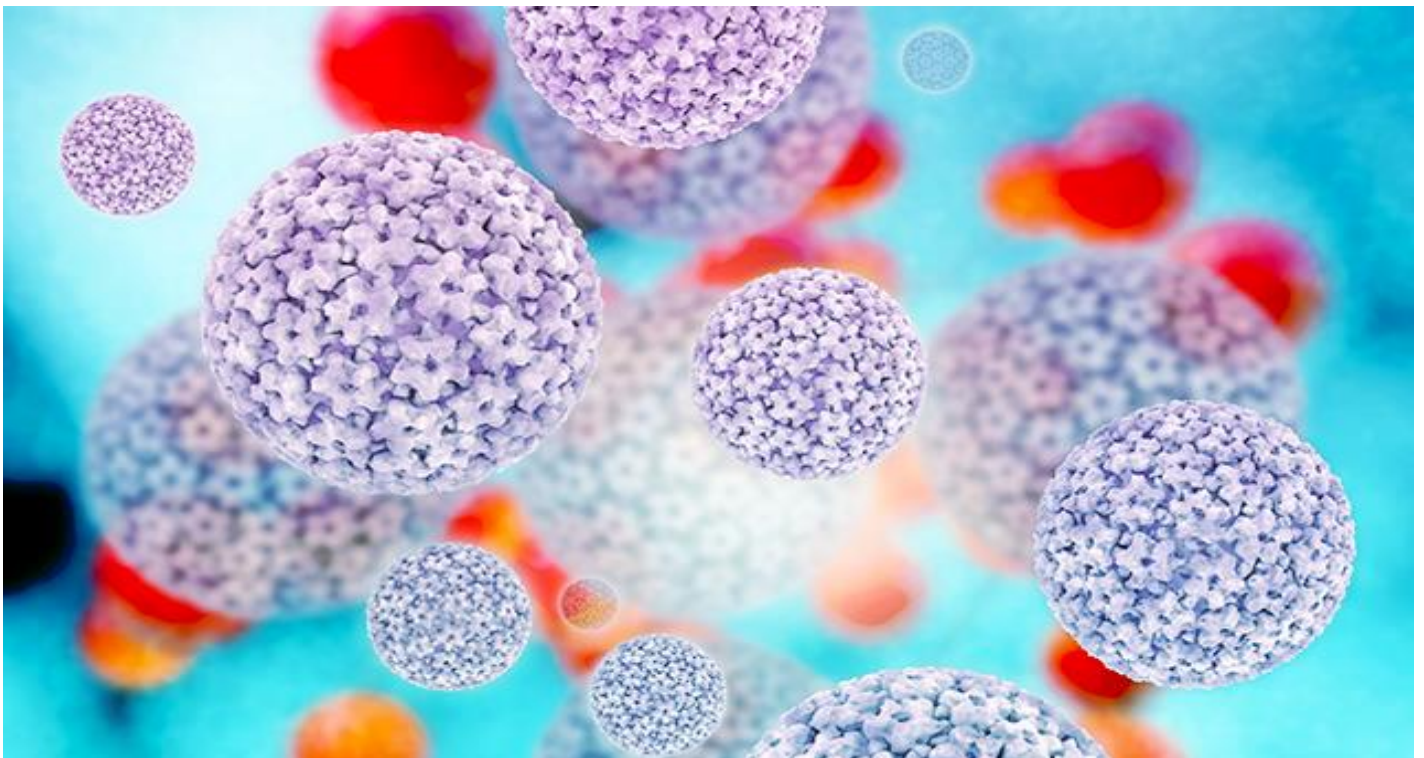
Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste trabalho será disponibilizado somente a partir de 02/06/2018.



Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Absence of Human papillomavirus in fresh tissue of oral cavity and oropharynx cancer in patients from the northwest region of São Paulo, Brazil

Ingrid da Silva Santos



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Araçatuba-SP
2017



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA – UNESP

INGRID DA SILVA SANTOS

**Absence of Human papillomavirus in fresh tissue of oral cavity
and oropharynx cancer in patients from the northwest region of
São Paulo, Brazil**

Araçatuba- SP

2017

INGRID DA SILVA SANTOS

**Absence of Human papillomavirus in fresh tissue of oral cavity
and oropharynx cancer in patients from the northwest region of
São Paulo, Brazil**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia do Campus de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”- UNESP, para obtenção do título de “Mestre em Odontologia”- Área de Concentração Estomatologia.

Orientador: Professor Titular Glauco Issamu Miyahara.

Co- orientadores: Professor Assistente Doutor Daniel Galera Bernabé.

Professora Adjunto Sandra Helena Penha de Oliveira.

Araçatuba- SP

2017

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

S237a

Santos, Ingrid da Silva.

Absence of Human papillomavirus in fresh tissue of oral cavity and oropharynx cancer in patients from the northwest region of São Paulo, Brazil / Ingrid da Silva Santos. – Araçatuba, 2017

53 f. ; il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientador: Prof. Glauco Issamu Miyahara

Coorientador: Prof. Daniel Galera Bernabé

Coorientadora: Profa. Sandra Helena Penha de Oliveira

1. Papillomaviridae 3. Oropharyngeal neoplasms 3. Head and neck neoplasms 4. Mouth neoplasms I. T.

Black D6

CDD 617.63

DEDICATÓRIA

Eu dedico esse estudo e a alegria de estar vivendo esse momento:

À **minha família**, especialmente meus pais, **Aderson Veiga dos Santos e Francisca da Silva Vieira**, por todo o amor e cuidado que me dedicam todos os dias e por terem permitido e suportado ter a formação que sustento hoje.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Glauco Issamu Miyahara, por ter me escolhido na seleção de Mestrado (Outubro-2014) e por ter aceitado seguir comigo o caminho da orientação.

Aos meus queridos pacientes, não somente desse estudo, mas todos aqueles que tive a oportunidade de conhecer nesse período da pós-graduação. Foram a minha motivação, e agradeço imensamente por terem confiado e compartilhado suas experiências comigo. Pelos exemplos de perseverança e superação, pelas verdadeiras lições de vida.

AGRADECIMENTOS

Com o coração cheio de amor, agradeço imensamente por ter tanto para agradecer. Tive muitas pessoas ao meu lado para que eu chegasse até aqui, na minha vida e na minha profissão.

Minha eterna gratidão...

A **Deus**, por me permitir realizar mais um sonho. Por me guiar e dar força para prosseguir nesses caminhos que a vida proporciona. Quão divino é sentir seu amor e sua presença nos mais diversos momentos dessa jornada que é a vida!

Aos meus pais, **Aderson e Francisca**, pelos valores imensuráveis que me ensinaram e que me fazem acreditar diariamente que não há nada melhor nessa vida do que estar sempre ao lado da verdade, da justiça e de boas pessoas. Vocês são meu maior exemplo de honestidade e de tudo que possa significar o sentimento de amor. Obrigada por todo apoio nas minhas escolhas de vida e pela compreensão da distância física durante esse período. Eu sou muito feliz por Deus ter me concedido a vocês, benção maior não há!

A minha família, tão grande em número como na quantidade de amor que nos une. Meus irmãos, **Adrielle, Rosicleide “Quequê”, Aurinete, Jeane, Armando e Arlindo**. Meus sobrinhos, **Caleb, Serginho, Gustavo, Bia, Lucas, Tatá** e a mais nova da turma, que está a caminho, minha primeira sobrinha de laço sanguíneo (**Marina**). Minha madrinha, **Maria**. Minhas cunhadas, **Cota e Joelma**. Minhas tias, **Raimunda e Rosa**. Meus primos-irmãos, **Hélio e Gui**. E os companheiros **Mary Jane, Bob e Fred**. Essa fase do Mestrado em que tive que morar fora de casa pela primeira vez, me fez enxergar ainda mais a força de vocês e da nossa união. Eu jamais teria conseguido se não fosse pelo apoio de todos, não somente financeiro, mas por cada oração, motivação e força, especialmente em todas as idas e vindas no Aeroporto de Manaus, momento em que mais nos abalava emocionalmente. Cada despedida partia meu coração de tanta saudade daqueles dias junto de vocês. Obrigada minha querida família, pelo suporte imensurável e por terem me proporcionado viver mais um sonho entre tantos que sonharam comigo e que conseguimos realizar.

À família **Egashira- Oliveira**, por me acolherem, pelo incentivo que me foi dado para realizar a prova de Mestrado, desde o trajeto Manaus- Campo Grande- Araçatuba até o suporte para que eu conseguisse permanecer da melhor forma possível durante esse tempo na Cidade. Obrigada, **Eliana** e **Renato** por fazerem por mim, sem nenhuma diferença, tudo que fariam pelos filhos de vocês e, é assim que me sinto, como filha. Muita obrigada **Batiam Mieko**, por ceder não somente a sua casa nos momentos que precisei, mas pelo amor e cuidado de avó que tanto me deu. Obrigada, **Tio Hami**, **Tio Jun**, **Marlene**, **Camila**, **Carla**, **Yuri**, **Mikaela**, **Tia Yukie**, **Tia Beth** por todo o auxílio que me prestaram nesta fase e pelo enorme carinho de vocês. **Diego**, obrigada por ter dividido sua família comigo. Por ter sido o meu maior incentivador, por não ter medido esforços para que eu estivesse aqui, onde eu queria estar, mesmo que isso nos custasse enfrentar as barreiras de um relacionamento a distância. Obrigada por ter cuidado da saúde dos meus pais na minha ausência. Pelo amor que oferece a mim e a minha família e, pelos projetos de vida que compartilhamos. As palavras não conseguem exprimir tamanha gratidão e tanto amor que tenho por vocês.

Ao Professor **Glauco Issamu Miyahara**, meu orientador, obrigada pela grande oportunidade! Por ser sempre tão disponível durante todo esse período. Professor Glauco, apesar de não parecer, nossas inúmeras conversas, desde as reuniões sobre o seu modo de orientação do Mestrado, ou até mesmo sobre eu expor o que queria ou sentia para as pessoas (inclusive para o senhor) ou sobre eu não me cobrar tanto; as nossas discussões científicas intermináveis sejam na clínica ou no Cob, que me faziam voltar para casa com tamanha ansiedade para buscar por todas aquelas respostas, para que não me faltasse argumento e, que assim eu pudesse adquirir sua confiança um dia. Tudo isso me tornou uma pessoa um pouco mais resiliente, no sentido mais completo da palavra (sem deixar a minha sensibilidade extrema). E percebi que esse era um dos maiores aprendizados que queria me repassar. Foram mudanças essenciais para a minha vida profissional e para que eu fosse uma pessoa mais forte a cada dia. Agradeço ao senhor por visualizar o curso de Mestrado como além de um pesquisador em formação. Por exigir sempre um bom conhecimento teórico de Estomatologia, e acima de tudo, um bom relacionamento com o paciente e com a equipe de trabalho. E assim eu tentei, diante das minhas dificuldades de timidez e de insegurança. Espero, professor Glauco,

que eu tenha conseguido conquistar sua confiança e contribuído um pouco com a sua equipe, pois aquelas atividades eram o que mais amava realizar. E apesar da atualidade nos pressionar para viver em função do currículo, agradeço ao senhor por ter vivido além disso; a verdadeira essência do Mestrado. Obrigada professor, por seu exemplo de integridade em um meio tão competitivo e muitas vezes injusto. Por muitas vezes, o vi aparentemente triste pelas coisas que não estavam caminhando da forma como gostaria, mas nunca o vi abrir mão das normas e daquilo que achava que era correto. Obrigada por nos ajudar a enxergar o simples com tanta grandiosidade. Agradeço ainda por tantas vezes ter assumido um papel de pai (apesar da idade) me aconselhando e acolhendo quando meus pensamentos e o meu coração estavam confusos e angustiados. Obrigada por guiar meus primeiros passos nesse caminho e por seu apoio nos momentos que precisei. Por todos esses ensinamentos que me proporcionou, e por todos os outros que me ensinou sem perceber. Certamente, os levarei com todo carinho e com imensa gratidão por onde quer que eu vá.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Amazonas (FAO-UFAM), aos docentes e servidores técnico-administrativos desta Instituição. Um agradecimento especial aos docentes **Nikeila Conde, Juliana Pereira, Tânia Cristina, José Eduardo, Lia Ono, Cláudia Simões, Emílio Sponchiado** por além da minha formação acadêmica com tanta dedicação, participarem comigo das trilhas desse caminho. Pelo exímio esforço que realizaram para que eu conseguisse aprovação em julgamento para a colação de grau especial e, assim conseguir a matrícula no Mestrado. Muito obrigada!

Aos meus colegas da graduação pela torcida e por todo carinho sempre. Aos amigos que fiz durante a faculdade para a vida além dela, **Carla Priscila, David Dabela, Fabíola Araújo, Bianca Trajano e Deborah Azulay**. Obrigada pelo apoio essencial nas horas difíceis que passamos desde a graduação, pelo companheirismo que nos une, e pelos milhares de momentos alegres e divertidos que me proporcionam quando estamos juntos. Por tentarem me fazer enxergar a vida de um jeito mais leve e por tanto amor que demonstram por mim. Amo vocês!

Aos meus amigos queridos, **Andreza Canto, Aline Oliveira, Fabrício Farias, Luciana Strieder, Victor Barroso, Wilson Neto, Zilclei Carvalho**, pela torcida fiel para realização dos meus sonhos. Por sempre se fazerem presentes mesmo com a distância

física. Pelos conselhos, pela disponibilidade de sempre e por preservarem a nossa amizade que tanto estimo. Por cada vez que volto para Manaus me enchem de carinho e alegria com abraços que me enchem de motivação. Amo todos vocês!

À Faculdade de Odontologia do Câmpus de Araçatuba, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FOA – UNESP), representada pelos Professores, diretor **Dr. Wilson Roberto Poi** e vice-diretor **Dr. João Eduardo Gomes Filho**. Ao programa de pós-graduação stricto sensu em Odontologia, coordenado pelo Prof. Dr. **André Luiz Fraga Briso**, pela oportunidade de realizar o curso de Mestrado nesta Instituição.

Ao Prof. **Éder Ricardo Biasoli**, pela contribuição na minha formação clínica e pelos ensinamentos que compartilhou. Sendo estes, através de muitas histórias, em que a maioria era ele o personagem principal. Ensinamentos que ultrapassaram as barreiras do Mestrado, para a vida que há fora dele.

Ao Prof. **Daniel Galera Bernabé**, meu co-orientador. Por ter dividido seu imenso e intelectual conhecimento na área de Estomatologia. Um dos maiores responsáveis pela minha formação teórica e científica. Foi um aprendizado imensurável, professor! Por todas as ideias e experiências que compartilhou comigo durante o curso. Pelas discussões de casos que tanto me acrescentaram. Por permitir muitas vezes diante de algo novo, que descobríssemos juntos através dos estudos que me solicitava. Por tantas vezes que escutou e permitiu que tomasse algumas condutas pela confiança que me atribuía. Pela oportunidade de um crescimento muito rico e intenso através das atividades da Pós-graduação que me foram concedidas. Pelas sugestões oportunas durante a realização deste estudo. No entanto, tenho que agradecê-lo por algo além de tudo isso. Por dar importância para além da doença; o doente e todos os seus sentimentos. Principalmente aqueles que eram na maioria das vezes inconscientes. Eram esses os fenômenos que de alguma forma nos ligaram. Obrigada, professor Daniel por ter me enxergado quando eu me sentia completamente invisível. E por ter me dado coragem de uma forma muito peculiar para que além disso, eu me manifestasse através das minhas opiniões, que eram tão fortes dentro de mim, mas não tinham som.

À Prof.^a **Kellen Tjioe**, por quem tenho profunda admiração. Um dos maiores exemplos que tenho de dedicação a tudo que se propõe a realizar, seja como docente ou pesquisadora. Por ser além de meritória cientista, uma valorosa ser humano. Obrigada pelo imensurável aprendizado que me proporcionou na Estomatologia e na vida pessoal. Por me guiar com toda clareza e honestidade indicando os acertos e, nos erros ajudando-me a melhorar. Por ser firme nos momentos que precisava ser e por ter sempre a disposição de ajudar a quem precisar. Professora Kellen, não sei como agradecer por tudo que fizeste por mim, por ter contribuído tanto com a minha formação e desenvolvimento nesse período. Por toda motivação e a confiança que depositou em mim nos momentos que pensei que não ia conseguir realizar algo. Por ter disponibilizado seu tempo para me escutar e conversar comigo diversas vezes. Por nossos momentos descontraídos, dos quais sentirei muita falta. É um grande privilégio ter conhecido alguém tão inteligente, especial e amiga. Muito obrigada por tudo!

À minha co-orientadora Prof.^a **Sandra Helena Penha de Oliveira** pelo aceite da sua co-orientação, por ceder o seu laboratório, bem como toda sua infraestrutura para realização da maior parte dos experimentos deste estudo. Por ser um exemplo de pessoa generosa, deixando as portas do seu laboratório sempre abertas para quem necessitar. Por ser sempre prestativa nos momentos de necessidade. Por nos alegrar com o seu jeito irreverente que o faz ser tão querida e especial para todos nós.

Ao Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, representado pela Prof.^a **Leda Maria Salzedas** e Prof. **Marcelo Crivelini**. Aos docentes, Prof.^a **Ana Maria Soubhia**, Prof.^a **Cristiane Furuse**, Prof.^a **Ana Claudia Okamoto**, Prof.^a **Renata Callestini Felipini** e Prof.^a **Agnes Assao** pelos conhecimentos transmitidos, pela calorosa recepção no departamento, por todo carinho e preocupação comigo. Aos funcionários, **Adriana de Paula**, **Marli Santos** e **Giseli Kayahara** por toda gentileza e auxílio prestado.

A toda equipe do Centro de Oncologia Bucal (COB) da FOA-UNESP. **Jane Fátima**, **Jefferson Teixeira**, **Janaína Zavitoski**, **Suzy Elaine Freitas**, **Anne Cocato**, **Daniene Ribeiro**, **Regiane Nogueira**, **Gabrielle Duarte**, **Bruna Sarafim**, **Fátima**, **Francisco Collado**, **Sebastião Conrado**. Eu queria agradecer de todo coração por todo o acolhimento desde o momento que cheguei. Por todos os momentos que necessitei de auxílio seja para aprender qualquer parte do funcionamento do Cob, até por problemas de saúde. E vocês estiveram

sempre dispostos e preocupados em ajudar. Pelo convívio durante esses dois anos e meio que dividimos essa casa, pois na maior parte do tempo, era lá que eu estava. Pela oportunidade de aprendizado através dos mais diversos temas discutidos durante as nossas conversas, que me fizeram refletir e tentar evoluir a cada dia como pessoa e profissional. Por serem exemplos de pessoas que exercem o trabalho com tanta seriedade e de um laço afetivo enorme com cada paciente matriculado no Cob. Por toda ajuda e disponibilidade em ajudar no recrutamento de pacientes para as pesquisas. Por toda a colaboração essencial durante as dificuldades da coleta e do ambulatório. Por cada palavra de apoio e de motivação que recebi de vocês nos momentos que necessitei. E acima de tudo pela amizade que construímos dentro e fora do Cob. Pelos momentos de lazer tão divertidos, pelas comemorações de fim de ano que me faziam sentir tamanha alegria em poder participar. Por muitas vezes me receberem na casa de alguns de vocês, fazendo com que a saudade da família fosse diminuída pelo afeto que me foi oferecido. De todo coração, espero ter contribuído com a equipe de alguma forma durante esse período. Sentirei muita saudade dessa casa e levo comigo um pouquinho de cada um de vocês no coração!

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da FOA - UNESP, **Valéria Zagatto, Cristiane Lui e Lilian Mada** por toda a disponibilidade, pelo enorme auxílio prestado em todas as etapas deste curso e, por toda a paciência e dedicação de vocês.

Aos alunos da graduação da FOA-UNESP, **Dani Cantieri, Geane Barreto, Letícia Ferreira, Ana Daniela, Laís Faria, Ana Victória Butarelo, Mariana Souza, Fernanda Antunes, Taís Minomi, Felipe Yuudi, Jéssica Bugiga, Lia Kobayashi, Sandy Tatibana** pela receptividade, por toda ajuda que ofereceram e que prestaram durante os dois anos que fiquei inserida nas atividades junto de vocês e pelo enorme carinho comigo. Os que atualmente são cirurgiões-dentistas, **Wiry Samara, João Pedro Mazzon, Amanda Luz e Ana Rafaela Curvo**. Obrigada a todos vocês, pelo aprendizado que me proporcionaram das mais diversas formas, foram superiores aqueles que tinha para oferecer a vocês.

Ao meu professor de inglês neste período de mestrado, **Vinícius Moroni**, por todo aprendizado que me acrescentou com toda sua paciência, empenho e bom humor durante aulas. Aos colegas da turma de inglês, **Aneliza, Ketelin, Mayra e José Guilherme** por tornarem as aulas um momento divertido e prazeroso.

A equipe do laboratório de Farmacologia, especialmente a **Aline Takamiya** e **Victor Balera** por serem sempre prestativos e gentis em todos os momentos que precisei de auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos professores **Cáris Maroni Nunes** e **Fernando Garcia** do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular Animal (LBBMA) da Faculdade de Odontologia e Curso de Medicina Veterinária de Araçatuba – UNESP por disponibilizarem este laboratório para realização de alguns experimentos e por todo auxílio prestado.

À Prof.^a **Maria Lúcia Sundefeld**, por disponibilizar o seu tempo com toda dedicação em ajudar toda a equipe da pós-graduação com as análises estatísticas. Obrigada por todo auxílio nas minhas inúmeras dúvidas neste e em outros trabalhos.

Aos professores **Marcelo Goiato** e **Maria José Nagata**, que compuseram a banca do meu Exame Geral de Qualificação, pela disponibilidade em participarem daquele momento importante e pelo primor na avaliação diante de suas contribuições.

À Dra. **Luisa Lina Villa**, Coordenadora do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das Doenças Associadas ao Papilomavírus- INCT-HPV, pelo aceite em disponibilizar que parte das análises desse estudo fossem realizadas no referido Instituto. Por compartilhar com nossa equipe seu conhecimento acerca do tema, com presteza em ajudar nas nossas dúvidas e nas dificuldades que encontramos ao longo da pesquisa. Por permitir que conhecêssemos o Instituto e acompanhássemos a realização de algumas amostras. Agradeço também a Dra. **Bárbara Mello**, que realizou o teste (Linear Array). Pela sua contribuição para análise dos resultados e por sua excelente assistência técnica. Por ter nos recebido com muita gentileza no Instituto e compartilhado um pouco do seu conhecimento e da sua rotina.

Um agradecimento muito especial aos meus companheiros de trabalho e amigos que fiz durante o curso de Mestrado. **Aneliza Silva** e **Daniela Bastos**, pela experiência que vivemos juntas, dividindo a moradia, os anseios da nova fase e com eles, os bons e os maus momentos. Com certeza para todas nós, cada momento compartilhado foi um grande aprendizado para nossa vida e evolução como ser humano. Muito obrigada pelos cuidados de vocês, pelos conselhos e conversas que tiveram comigo (repetidas vezes) e, por todos os ensinamentos que me proporcionaram. **Aneliza**,

obrigada por toda preocupação comigo, por sua torcida para a realização dos meus projetos de vida, por tentar (incansavelmente) me convencer de levar a vida com mais leveza e alegria, e especialmente pela amiga que você é, e por cultivar nossa amizade superando todas as dificuldades. **Dani**, gostaria de te agradecer ainda pela rica troca dos papéis de mãe, irmã e amiga que dividimos inúmeras vezes e que tanto nos fizeram crescer. De fato, nós tínhamos uma simbiose, mas por motivos maiores e necessários, nós sofremos um processo de evolução imenso, de aprendizado, e com isso adquirimos maturidade e independência. Obrigada por sua companhia e por todas as nossas boas lembranças juntas. **Lígia Ferreira** e **Vitor Bonetti** pela recepção de vocês como veteranos, por todo auxílio que ofereceram, e pelos ensinamentos dos anos anteriores que compartilharam. Por tantos bons momentos que vivemos que já estão saudosos em meus pensamentos, de muitas risadas e alegria, sejam no Cob ou fora dele. Muito obrigada! Foram muitos momentos felizes junto de vocês dois e com a **Dani**, quando éramos um quarteto no Cob. Além disso, por todos os momentos difíceis que estivemos unidos. **Bonetti**, obrigada por ter sido meu grande companheiro em uma fase muito importante. **Lígia**, agradeço ainda mais pela equipe que formamos quando éramos somente nós duas, quantos momentos dividimos nessa fase. Por ser parceira e por todo conhecimento que dividiu comigo. Pela realização desse trabalho e com ele, todas as inúmeras dificuldades que enfrentamos juntas. E principalmente, pela grande amizade que construímos. As colegas que iniciaram o curso comigo, **Ketelin Dal Prá**, **Flávia Verza**, **Bruna Sarafim**, e que se tornaram minhas grandes amigas. São exemplos de pessoas esforçadas, determinadas, fortes e com tanto carinho a oferecer, cada uma do seu jeitinho. Obrigada pela oportunidade de crescer com os exemplos de vocês, pela confiança que depositaram em mim e por nossa amizade. Por todas as vezes que dedicaram parte do tempo de vocês para conversarem comigo sobre qualquer assunto, pelas palavras tão encorajadoras, de uma maturidade plena e com tanta sinceridade. Por toda a preocupação que sempre demonstram comigo. Sou eternamente grata por tudo que fizeram por mim. Aos mais novinhos da turma, **Saygo Tomo** e **Jéssica Figueira**, de tanto compartilharmos, tornamo-nos amigos. Que trio! Obrigada pelas trocas riquíssimas de conhecimentos e ideias. Pelo apoio essencial e por me ajudarem a seguir nas horas de incertezas. Por terem despertado em mim, o espírito da infância com todos os bons sentimentos dessa fase, com infinitos momentos de diversão e alegria vividos nesse tempo e pelas muitas

travessuras que aprontamos juntos, extraindo até dos momentos de tristeza um motivo para rir e para nos unir cada vez mais. Quantas saudades eu sentirei dos nossos dias tão felizes. Por tantas conquistas pessoais e profissionais que alcançamos juntos. **Saygo**, obrigada por ser um grande companheiro, seja qual for o momento. Por sua exímia colaboração na execução deste estudo. Por tornar a minha vida mais feliz com sua presença e cumplicidade. Por nossa união que nos fez superar juntos tantas dificuldades! Por ser a pessoa com quem discutia os casos clínicos, a mesma com quem discutia sobre os tipos e criação de animais. Obrigada por ser a mesma pessoa que me ensinou sobre o mundo científico e sobre determinação. Por ser a pessoa que compartilha uma profissão comigo, a mesma com quem compartilho uma grande amizade. **Jéssica**, engana-se quem acha que pessoas de comportamentos diferentes não podem ser amigas. Eu aprendi durante o mestrado, que não importa se as pessoas têm posturas opostas, é sempre e para sempre o caráter que o faz as tornarem próximas. Obrigada por ser essa amiga sincera, por chamar minha atenção quando foi necessário para que eu pudesse ser mais firme e forte. Obrigada pelo exemplo de liderança. Agradeço imensamente a Deus pelo privilégio e pelo presente de ter amigos como vocês. A mais nova integrante do curso, **Stephanye Biss**, obrigada por todo carinho, confiança, e pela amizade que estamos construindo.

De todo meu coração, agradeço a todos vocês que estiveram ao meu lado nessa fase tão importante da minha vida. Se o destino nos uniu por um objetivo em comum, hoje escolhemos seguir unidos pela amizade!

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas– FAPEAM**, pela bolsa concedida durante 20 meses (processo n°001/2015, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas- FAPEAM).

MUITO OBRIGADA!

“Seu trabalho vai preencher uma parte grande da sua vida, e a única maneira de ficar realmente satisfeito é fazer o que você acredita ser um ótimo trabalho. E a única maneira de fazer um excelente trabalho é amar o que você faz”.

- Steve Jobs

Santos IS. Ausência de papilomavírus humano em tecido fresco de câncer da cavidade oral e da orofaringe em pacientes da região noroeste de São Paulo, Brasil. [dissertação]- Araçatuba: Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista; 2017.

RESUMO

Evidências sugerem que o papilomavírus humano (HPV) está associado com um subgrupo de carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço (HNSCC). No entanto, a prevalência do HPV varia substancialmente dependendo do local anatômico e da região geográfica estudada. Aqui, nosso objetivo foi investigar a prevalência do HPV em amostras de tecido fresco de pacientes brasileiros com carcinoma de células escamosas (CEC) de boca e orofaringe combinando dois métodos confiáveis para a detecção do HPV. Foram recrutadas trinta e seis amostras de tecido fresco provenientes de CEC de boca (n= 27) e orofaringe (n= 9) para análises. As características sociodemográficas, estilo de vida e clinicopatológicas foram coletadas através dos prontuários. O DNA do HPV foi detectado por dois métodos: reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real através de ensaio qualitativo de presença ou ausência do HPV-16, e testado para 37 genótipos usando Linear Array. A amplificação do gene β -globina funcionou como controle interno positivo para a análise do DNA em todas as amostras. O DNA do HPV não foi detectado em nenhum dos casos de amostras de tecido de pacientes com CEC em ambos os métodos utilizados. A ausência do HPV observada em nosso estudo pode sugerir que este não é um fator de risco prevalente nos CECs de boca e orofaringe nesta região geográfica. Os fatores de risco clássicos para o desenvolvimento desses tumores parecem ser ainda a principal causa nessa população brasileira. Investigações detalhadas do estilo de vida com maior amostragem precisam ser melhor exploradas para compreensão da baixa prevalência encontrada.

Palavras-Chave: Papillomaviridae, Neoplasias Orofaríngeas, Neoplasias de Cabeça e Pescoço, Neoplasias de boca.

Santos IS. Absence of Human papillomavirus in fresh tissue of oral cavity and oropharynx cancer in patients from the northwest region of São Paulo, Brazil. [dissertation]- Araçatuba: UNESP- São Paulo State University; 2017.

ABSTRACT

Evidence suggests that human papillomavirus (HPV) is associated with a subgroup of squamous cell carcinomas of the head and neck (HNSCC). However, the prevalence of HPV varies substantially depending on the anatomical site and geographic region studied. Here, our goal was to investigate the prevalence of HPV in fresh tissue samples from Brazilian patients with squamous cell carcinoma (SCC) of the oral cavity and oropharynx by combining two reliable methods for the detection of the HPV DNA. We recruited thirty-six fresh tissue samples from SCC of the oral cavity (n= 27) and oropharynx (n= 9) for analysis. The sociodemographic, lifestyle and clinicopathological characteristics were obtained from individual medical records. HPV DNA was detected by two methods: real-time polymerase chain reaction (PCR) through the qualitative assay of presence or absence for HPV-16, and tested for 37 genotypes by the Roche Linear Array. Amplification of the β -globin gene functioned as a positive internal control for DNA analysis in all samples. HPV DNA was detected in none of the tissue samples from patients with SCC in both methods. The absence of HPV observed in our study may suggest that this is not a prevalent risk factor in SCC of the oral cavity and oropharynx in this geographical region. The classic risk factors for the development of these tumors seem to be still the main cause in this Brazilian population. Detailed investigations of lifestyle with larger sample needs to be better explored to understand the low prevalence found.

Keywords: Papillomaviridae, Oropharyngeal neoplasms, Head and neck neoplasms, Mouth neoplasms.

LIST OF FIGURES

- Figure 1.** The algorithm used for the detection of HPV status of 36 OSCC and OPSCC patients indicating results according to real-time PCR and Linear array. 32
- Figure 2.** Qualitative real-time PCR results for HPV-16 detection in fresh tissue samples from patients with OSCC and OPSCC evidencing a SiHa cells line sample was used as a positive control (red), samples with absence of viral DNA (green), the positive internal control (IPC) for each reaction (blue) and the three types of negative control (black). 33
- Figure 3.** Linear array genotyping test result for HPV in OPSCC (n=7), evidencing that the samples were negative for the presence of HPV (samples 13 to 19). All samples were positive for the β -globin gene (lower blue line). Positive control of HPV16 (sample 10: showing upper blue band) and negative control worked properly (sample 20). 34

LIST OF TABLES

Table 1.	Sociodemographic, lifestyle and clinicopathological characteristics of patients with carcinoma of the oral cavity and oropharyngeal.	29
Table 2.	Distribution of patients according to anatomical tumor site.	31
Table 3.	Lifestyle related risk factors.	31

LIST OF ABBREVIATIONS

HNSCC - head and neck squamous cell carcinoma

SCC - squamous cell carcinomas

HPV - human papillomavirus

HPV16 - human papillomavirus type 16

OPSCC - oropharyngeal squamous cell carcinoma

OSCC - oral cavity squamous cell carcinoma

STI - sexually transmitted infection

P53 - tumor suppressor protein p53

pRb - retinoblastoma tumor suppressor protein

DNA - deoxyribonucleic acid

PCR - polymerase chain reaction

ISH - in situ hybridization

TNM - tumor node metastasis

β -globin - beta-globin

μ l - microliter

nm - nanometer

IARC - International Agency for Research on Cancer

FFPE - formalin-fixed paraffin embedded

SUMMARY

1 Introduction.....	20
2 Materials and Methods	23
3 Results	28
4 Discussion	35
References	42
Annex A.....	48
Annex B.....	50

Absence of Human papillomavirus in fresh tissue of oral cavity and oropharynx cancer in patients from the northwest region of São Paulo, Brazil.

Authors

Ingrid da Silva Santos^{1¶}, Lígia Lavezo Ferreira^{1&}, Saygo Tomo^{1&}, Sandra Helena Penha de Oliveira^{2#}, Eder Ricardo Biasoli^{1&}, Daniel Galera Bernabé^{1&}, Luísa Lina Villa^{3,4#}, Glauco Issamu Miyahara^{1¶*}

Affiliations

¹ Oral Oncology Center, Department of Pathology and Clinical Propedeutics, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil.

² Oral Oncology Center, Department of Basic Sciences, São Paulo State University (UNESP), School of Dentistry, Araçatuba, Brazil.

³ Molecular Biology Laboratory, Center for Translational Research in Oncology, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁴ Department of Radiology and Oncology, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

Conflicts of interest: None.

Funding sources: None.

*Correspondence to:

E-mail address: miyahara@foa.unesp.br (GIM)

Authors' contributions

[¶]These authors were the main researchers responsible for the design and execution of the study and made drafting and critical revision of the manuscript.

[&]Participated in the collection of samples, the first part of the molecular analysis, in the interpretation of the data and revision of the manuscript.

[#]Responsible for the technical assistance in the testing and in the interpretation of data.

1 Introduction*

Head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a major public health problem. This group encompasses anatomical regions as the oral cavity, oropharynx, hypopharynx, nasopharynx and larynx [1]. It is the sixth most common malignant neoplasm worldwide, contributing to an annual incidence of approximately 600,000 and over 300,000 deaths per year. Countries such as India and Brazil are considered endemic [2]. In Brazil, head and neck cancer is among the ten most prevalent types of cancer [3]. The squamous cell carcinoma (SCC) is the most common histological type corresponding to 90% of cases [4].

The most well-established and strongly associated risk factors in the development of HNSCC include tobacco and alcohol consumption, which can act in synergy potentializing its effects [1]. In recent decades, evidence has shown that HNSCC associated with tobacco use is declining in developed countries due to factors related to increased information regarding smoking-related risks and focus on prevention programs to reduce this habit [1,4]. In contrast, a subgroup of HNSCC had an alarming increase reported by many studies worldwide and these were attributed to human papillomavirus (HPV) infection. This tendency is observed mainly in the economically more developed countries, being considered by some authors, such an epidemic [5-10].

HPV is a double-stranded DNA epitheliotropic virus, and more than 200 genotypes have been already identified [1,8,9]. The virus can be classified as low risk, which are responsible for benign lesions, and high-risk HPV genotypes, related to some types of malignant tumors [1,4,7,8].

* Standards of the journal PLOS ONE

HPV exposure is highly common, occurring through orogenital contact or other sexual behavior, being recognized as a sexually transmitted infection (STI) [11,12]. The immune system eliminates the infection, however, exposure to a subtype of high-risk HPV can lead to a persistent infection which might predispose the infected subjects to malignant neoplasms. They play a causal role of HPV in the head neck carcinogenesis has been subject of exhausting investigations [4-10]. However, molecular evidence provide support for a causal role of high-risk HPV infection in the carcinogenesis of head and neck tumors through the inactivation of tumor suppressor proteins p53 and retinoblastoma (pRb) by overexpression of two the viral oncogenes E6 and E7, respectively [11-18]. This results in cell cycle dysregulation and consequently, the immortalization and transformation of host cells [11,17]. About fifteen high-risk HPV genotypes can lead to cancer, but the HPV-16 is by far the most prevalent regardless of the anatomical site of disease [9-14].

The HPV is now established as a causal factor for cancer of the cervix, anus, vulva, penis and head and neck, especially squamous cell carcinomas of the oropharynx (OPSCC) [11-14]. Although HPV has a proven association with OPSCC, other studies have demonstrated the presence of the virus in squamous cell carcinoma of the oral cavity (OSCC), but this relationship remains controversial [9,14]. HPV-positive HNSCC represents a distinct molecular, clinical and epidemiologic entity compared to HPV-negative HNSCC. [19]. Studies have reported that patients with true HPV-positive HNSCC are strongly associated to a significantly superior outcome, reflecting a better prognosis and longer survival, regardless of the therapy performed [7,10,20]. Therefore, more accurate virus detection methods become essential due to diagnostic relevance

of identifying HPV in the HNSCC [2,8,15,17,20]. However, strategies for detecting viral involvement in tumors differ not only in their designs but in the detection targets and in the types of biological materials used [17,21,22]. Consequently, this implies different rates of HPV prevalence in HNSCC.

In a recent study evaluating the HPV prevalence in HNSCC with over than 3.000 tumors tested for HPV-16 with E6 mRNA and p16^{INK4a}, the authors reported that nearly 22% of OPSCC could be attributed to HPV infection, whereas fewer than 5% of oral cavity and laryngeal cancers were HPV-positive [23]. A systematic review and meta-analysis on the global prevalence showed that the prevalence of HPV in OSCC was 24.2% on average, compared with 45.8% in the oropharynx [24]. For the OSCC group, HPV detection rates are even more variable, from 0-100% [25]. Moreover, the rates of HPV-related HNSCC seem to be exposed to geographical variations. Highest rates are reported in Northern America, Asia, Europe while prevalence in the South America is generally lower [26].

Given this wide prevalence, studies regarding the HPV detection in HNSCC in Brazil are scarce and show widely heterogeneous rates between the regions. Therefore, the current report was designed to investigate the HPV prevalence in oral cavity and oropharynx SCC from of Brazilian patients. For this purpose, we used a protocol which includes real-time PCR for HPV-16 and linear array genotyping method.

References*

1. Mehanna H, Paleri V, West C, Nutting C. Head and neck cancer—Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *BMJ* 2010; 341: 663–6.
2. Lewis A, Kang R, Levine A, Maghami E. The New Face of Head and Neck Cancer: The HPV Epidemic. *Oncology (Williston Park)* 2015; 29(9):616-26.
3. INCA (Instituto Nacional do Câncer). Available at: www.inca.gov.br; 2016.
4. Albano PM, Holzinger D, Salvador C, Orosa J, Racelis S, Leaño M, et al. *PLoS One* 2017;15;12(2): e0172240.
5. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 2009; 199:1263–9.
6. 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: 1944–56.
7. D'Souza G, Cullen K, Bowie J, Thorpe R, Fakhry C. Differences in oral sexual behaviors by gender, age, and race explain observed differences in prevalence of oral human papillomavirus infection. *PLoS One* 2014; 9: 19–21.
8. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. *Globocan 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 11*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; <http://globocan.iarc.fr> (2013).
9. Berman TA, Schiller JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. *Cancer* 2017; 27. doi: 10.1002/cncr.30588. [Epub ahead of print]
10. Gillison ML, Castellsagué X, Chaturvedi A, Goodman MT, Snijders P, Tommasino M, et al. Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. *Int J Cancer* 2014; 134: 497–507.

* Standards of the journal PLOS ONE

11. Gao G, Smith DI. Human Papillomavirus and the Development of Different Cancers. *Cytogenet Genome Res* 2017; 1. [Epub ahead of print]
12. Taberna M, Inglehart RC, Pickard RK, Fakhry C, Agrawal A, Katz ML, et al. Significant changes in sexual behavior after a diagnosis of human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative oral cancer. *Cancer* 2017;14. [Epub ahead of print]
13. Wasserman JK, Rourke R, Purgina B, Caulley L, Dimitroulakis J, Corsten M, et al. HPV DNA in saliva from patients with SCC of the head and neck is specific for p16-positive oropharyngeal tumours. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2017; 6;46(1):3.
14. Fakhry C, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, Zhang Y, Rettig E, et al. The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer* 2017; 27. doi: 10.1002/cncr.30353.
15. Dahlstrom KR, Bell D, Hanby D, Li G, Wang LE, Wei Q, et al. Socioeconomic characteristics of patients with oropharyngeal carcinoma according to tumor HPV status, patient smoking status, and sexual behavior. *Oral Oncol* 2015;51(9):832-8.
16. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. *J Natl Cancer Inst* 2000;92(9):709-720.
17. Benson E, Li R, Eisele D, Fakhry C. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2014; 50(6):565-74. doi: 10.1016/j.oraloncology.2013.09.008.
18. Agalliu I, Gapstur S, Chen Z, Wang T, Anderson RL, Teras L, et al. Associations of Oral α -, β -, and γ -Human papillomavirus types with risk of incident head and neck cancer. *JAMA Oncol* 2016; 21. doi: 10.1001/jamaoncol.2015.5504.
19. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2008;100:407–420. doi: 10.1093/jnci/djn025.
20. Ang KK. et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *New Engl J Med*. 2010; 363 (1):24-35.

21. Jalouli M, Jalouli J, Ibrahim SO2, Hirsch JM, Sand L. Comparison between single PCR and nested PCR in detection of human papilloma viruses in paraffin-embedded OSCC and fresh oral mucosa. *In Vivo* 2015; 29(1):65-70.
22. Westra WH. Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. *Oral Oncol* 2014;50(9):771-9. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.05.004.
23. Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quiros B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst* 2016; 28;108(6):djv403. doi: 10.1093/jnci/djv403.
24. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsagué X, Laporte, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16(INK4a) detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Oncol* 2014; 15:1319–31.
25. Chen XJ, Sun K, Jiang WW. Absence of high-risk HPV 16 and 18 in Chinese patients with oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. *Virology* 2016; 20;13:81.
26. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer* 2017; 1. doi: 10.1002/ijc.30716. [Epub ahead of print]
27. Zhang Y, Wang R, Miao L, Zhu L, Jiang H, Yuan H. Different levels in alcohol and tobacco consumption in head and neck cancer patients from 1957 to 2013. *PLoS One* 2015;13;10(4):e0124045.
28. Brouha X, Tromp D, Hordijk GJ, Winnubst J, De Leeuw R. Role of alcohol and smoking in diagnostic delay of head and neck cancer patients. *Acta Otolaryngol* 2005;125(5):552-6.
29. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D; World Health Organization. Classification of tumors. Pathology and genetics head and neck. Lyon: IARC Press 2005. 430 p.
30. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El GF, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol*. 2009;10:321–2.

31. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. *JAMA* 2012;307:693–703.
32. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human Papillomaviruses. Volume 90. Lyon, France: World Health Organization (WHO), IARC; Geneva, Switzerland: Distributed by WHO Press; 2007.
33. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol* 2013; 20;31(36):4550-9.
34. D'Souza G, Wentz A, Kluz N, Zhang Y, Sugar E, Youngfellow R, et al. Sex Differences in Risk Factors and Natural History of Oral Human Papillomavirus Infection. *J Infect Dis* 2016;15;213(12):1893-6.
35. Syrjänen S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol* 2010; 21 Suppl 7: vii243–5.
36. Chaturvedi AK. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol* 2012; 6 Suppl 1: S16–24.
37. Chaturvedi AK, Graubard BI, Broutian T, et al. NHANES 2009–2012 findings: association of sexual behaviors with higher prevalence of oral oncogenic human papillomavirus infections in U.S. men. *Cancer Res* 2015;75:2468–77.
38. Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, et al. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol* 2011; 40: 489-502.
39. Piña AR, Jimenez LS, Mariano FV, de Andrade BA, Carlos R, Altemani A, de Almeida OP. Human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from Guatemala and Brazil. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2016;121(4):412-8.
40. Betiol JC, Sichero L, Costa HO, de Matos LL, Andreoli MA, Ferreira S, et al. Prevalence of human papillomavirus types and variants and p16(INK4a) expression in head and neck squamous cells carcinomas in São Paulo, Brazil. *Infect Agent Cancer* 2016;4(11):20. doi: 10.1186/s13027-016-0067-8.

41. Petito G, Carneiro MA, Santos SH, Silva AM, Alencar RC, Gontijo AP, et al. Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol* 2017;83(1):38-44.
42. Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, Beachler DC, Gheit T, Olshan AF, Wisniewski K, et al. Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. *Int J Cancer* 2017; 1;140(9):1968-1975.
43. Oga EA, Schumaker LM, Alabi BS, Obaseki D, Umana A, Bassey IA, et al. Paucity of HPV-Related Head and Neck Cancers (HNC) in Nigeria. *PLoS One* 2016; 6;11(4):e0152828. doi: 10.1371/journal.pone.0152828.
44. Blumberg J, Monjane L, Prasad M, Carrilho C, Judson BL. Investigation of the presence of HPV related oropharyngeal and oral tongue squamous cell carcinoma in Mozambique. *Cancer Epidemiol* 2015; 39(6):1000-5. doi: 10.1016/j.canep.2015.10.015.
45. Laprise C, Madathil SA, Allison P, Abraham P, Raghavendran A, Shahul HP, et al. No role for human papillomavirus infection in oral cancers in a region in southern India. *Int J Cancer* 2016;15;138(4):912-7.
46. Sgaramella N, Coates PJ, Strindlund K, Loljung L, Colella G, Laurell G, et al. Expression of p16 in squamous cell carcinoma of the mobile tongue is independent of HPV infection despite presence of the HPV-receptor syndecan-1. *Br J Cancer* 2015; 14;113(2):321-6.
47. Soares GR, Demathé A, Mattar NJ, Biasoli ER, Miyahara GI. Absence of HPV infection is associated with smoker patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *J Oncol* 2014;2014:371570.
48. Fakhry C, Gillison ML, D'Souza G. Tobacco use and oral HPV-16 infection. *JAMA* 2014;8;312(14):1465-7.
49. Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Lin HY, Fulp W, Papenfuss MR, Abrahamsen M, et al. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet* 2013;7;382(9895):877-87.
50. Melchers LJ, Mastik MF, Samaniego Cameron B, van Dijk BA, de Bock GH, van der Laan BF. Detection of HPV-associated oropharyngeal tumours in a 16-year cohort: more than meets the eye. *Br J Cancer* 2015;112(8):1349-57.

51. Braakhuis BJ, Brakenhoff RH, Meijer CJ, Snijders PJ, Leemans CR. Human papilloma virus in head and neck cancer: the need for a standardised assay to assess the full clinical importance. *Eur J Cancer*. 2009;45:2935–2939.
52. Polanska H, Heger Z, Gumulec J, Raudenska M, Svobodova M, Balvan J. Effect of HPV on tumor expression levels of the most commonly used markers in HNSCC. *Tumour Biol* 2016;37(6):7193-201.
53. Pannone G, Rodolico V, Santoro A, Lo Muzio L, Franco R, Botti G, et al. Evaluation of a combined triple method to detect causative HPV in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: p16 Immunohistochemistry, Consensus PCR HPV-DNA, and In Situ Hybridization. *Infect Agent Cancer* 2012;7:4.
54. D'Souza G, Westra WH, Wang SJ, van Zante A, Wentz A, Kluz N, et al. Differences in the Prevalence of Human Papillomavirus (HPV) in Head and Neck Squamous Cell Cancers by Sex, Race, Anatomic Tumor Site, and HPV Detection Method. *JAMA Oncol* 2016;8. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.3067.