

Chrystiano de Campos Ferreira

CARCINOMA ESPINOCELULAR DE OROFARINGE E SUA RELAÇÃO COM O HPV: PREVALÊNCIA DO VÍRUS EM ÁREAS DE DIFERENTES ÍNDICES DE DESENVOLVIMENTO HUMANO (IDH) EM UM MESMO PAÍS E ANCESTRALIDADE GENÉTICA

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação da fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rozany Mucha Dufloth

Co-orientadores:

Prof. Dr. Ricardo Ribeiro Gama

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina de Carvalho Peters

Barretos, SP

2021

Chrystiano de Campos Ferreira

CARCINOMA ESPINOCELULAR DE OROFARINGE E SUA RELAÇÃO COM O HPV: PREVALÊNCIA DO VÍRUS EM ÁREAS DE DIFERENTES ÍNDICES DE DESENVOLVIMENTO HUMANO (IDH) EM UM MESMO PAÍS E ANCESTRALIDADE GENÉTICA

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação da fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rozany Mucha Dufloth

Co-orientadores:

Prof. Dr. Ricardo Ribeiro Gama

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina de Carvalho Peters

Barretos, SP

2021

F382c Ferreira, Chrystiano de Campos.

Carcinoma espinocelular de orofaringe e sua relação com o HPV: prevalência do vírus em áreas de diferentes índices de desenvolvimento humano (IDH) em um mesmo país e ancestralidade genética. / Chrystiano de Campos Ferreira. - Barretos, SP 2021.

107 f. : il.

Orientadora: Rozany Mucha Dufloth.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2021.

1. 1. Carcinoma de células escamosas orofaríngeo. 2. Carcinoma de células escamosas oral. 3. Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. 4. HPV. 5. Papilomavírus Humano. 6. Índice de desenvolvimento humano. I. Autor. II. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570

Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Chrystiano de Campos Ferreira

“CARCINOMA ESPINOCELULAR DE OROFARINGE E SUA RELAÇÃO COM O HPV: PREVALÊNCIA DO VÍRUS EM ÁREAS DE DIFERENTES ÍNDICES DE DESENVOLVIMENTO HUMANO (IDH) EM UM MESMO PAÍS E ANCESTRALIDADE GENÉTICA”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia.

Data da aprovação: 18/08/2021

Banca Examinadora:

Prof^a. Dra. Ana Lucia Escobar

Instituição: Universidade Federal de Rondônia

Prof^a. Dra. Juliana Zuliani

Instituição: Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ Rondônia) / Universidade Federal de Rondônia (UNIR)

Prof^a. Dra. Patrícia Maluf Cury

Instituição: Faceres - São José do Rio Preto

Prof^a. Dra. Ana Carolina de Carvalho Peters

Coorientadora

Prof. Dr. Ricardo Gama

Coorientador

Prof^a. Dra. Rozany Mucha Dufloth

Orientadora

Prof. Dr. Ricardo dos Reis

Presidente da Banca

“Esta tese foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

Dedico este trabalho a minha esposa Hérika e aos meus filhos Igor, Pedro e João.

Obrigado por todo amor e compreensão. Vocês são a razão da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Rozany Dufloth por todos os conselhos e orientações.

Ao prof. Dr. Ricardo Gama e a Prof^a. Dr^a. Ana Carolina por todo o apoio, receptividade e orientações.

Ao prof. Dr. Rui Reis por todo o conhecimento que adquiri na área da ancestralidade.

Ao prof. Dr. André Lopes e a Prof^a. Dr^a. Patrícia Cury por todas as sugestões no projeto.

A Dr^a. Iara Santana e a toda a equipe da patologia.

À enfermeira Msc. Rayane Brandão e equipe do NAP (Núcleo de Apoio ao Pesquisador), por todo o apoio.

Ao fonoaudiólogo Paulo Sergio e toda a equipe da COREME e NAP de Barretos e Porto Velho por toda a logística e suporte.

Ao Dr. Jean Negreiros e ao Dr. Carlos Alexandre por terem acreditado em mim e incentivado o nosso projeto.

Aos professores e toda a equipe da pós-graduação, por permitirem que o meu trabalho fluísse na direção correta.

À equipe do departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço: Dr. Carlos Roberto dos Santos, Dr. Renato Capuzzo, Dr. Cleyton Dias, Dr. Domingos Boldroni Jr. e Dr. Ricardo Gama.

Aos meus amigos de HAA, em especial ao prof. Dr. Rodolfo Korte, Dr. Rafael Pires, Dra. Flávia Lenzi e Dra. Gabriele Gadelha pelo apoio e suporte no departamento nas horas mais difíceis.

Admiro muito vocês.

E por último, mas não menos importante a todos os pacientes que participaram do estudo.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	Epidemiologia dos Tumores de cabeça e pescoço	01
1.2	Biologia do HPV	06
1.3	Proteína p16 e sua relação com o HPV	08
1.4	Dados epidemiológicos do HPV	09
1.5	Métodos de diagnóstico do HPV	11
1.6	Relação do HPV com o câncer de cabeça e pescoço	12
1.7	Estadiamento dos tumores de orofaringe	14
1.8	Prevalência do HPV nos tumores de orofaringe	19
1.9	Características clínicas dos tumores de cabeça e pescoço relacionados ao HPV	21
1.10	HPV e prognóstico	22
1.11	Vacina contra o HPV	23
1.12	Tratamento do câncer de orofaringe	24
1.13	Ancestralidade genômica	24
2	JUSTIFICATIVA	26
3	OBJETIVO	28

3.1	Objetivo geral	28
3.2	Objetivos específicos	28
4	MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1	Instituições participantes	29
4.2	Desenho do estudo	29
4.3	População do estudo	29
4.4	Etapas da pesquisa	30
4.4.1	Coleta de dados clínico epidemiológicos	30
4.4.2	Formulário sobre hábitos e comportamento sexual	30
4.4.3	Identificação do status HPV	31
4.4.4	Análise de Ancestralidade	32
4.5	Análise estatística	33
4.6	Aspectos éticos	34
5	RESULTADOS	35
5.1	Dados epidemiológicos e características clínico-patológicas	35
5.2	Dados sobre o comportamento sexual e hábitos de tabagismo e etilismo	38
5.3	Regressão logística Uni e Multivariada	40
5.4	Ancestralidade genômica	42

6	DISCUSSÃO	45
7	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXOS	59
	ANEXO A – Índice de Desenvolvimento Humano nos estados Brasileiros em 2010	60
	ANEXO B - Ficha de coleta de dados	62
	ANEXO C - Formulário	65
	ANEXO D - Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa	68
	ANEXO E - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)	70
	ANEXO F – Artigo publicado na revista “Plos one”	75
	ANEXO G – Artigo enviado para submissão na revista “International Archives of Otorhinolaryngology”	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Regiões da cabeça e pescoço.	02
Figura 2	Consumo de Cigarros per capita em alguns países da União Européia e no Brasil, 1970- 2000 Incluindo o consumo ilegal. Dados expressos em número de cigarros consumido por ano, <i>per capita</i> .	03
Figura 3	A - Incidência observada e projetada para câncer de orofaringe, cavidade oral, laringe e outros sítios de faringe; B – Número de casos projetados para cânceres de orofaringe, cavidade oral, laringe e outros sítios de faringe até o ano de 2030 (Chaturvedi et. al. 2011)	04
Figura 4	Incidência de câncer de orofaringe: geral, HPV positivo e HPV negativo 1988-2004 em Hawaii, Iowa e Los Angeles (Chaturvedi et. al. 2011)	05
Figura 5	Representação do genoma do HPV	07
Figura 6	Principal atuação das proteínas virais sobre o ciclo celular.	08
Figura 7	Prevalência específica por tipo de HPV em um total de 2642 carcinomas espinocelulares (CECs) de cavidade oral, 969 de orofaringe, 1435 de laringe. Colunas com linhas diagonais representam CECs de cavidade oral; colunas pretas de orofaringe; colunas brancas de laringe. Laringe inclui também os tumores de hipofaringe (Retirado de Kreimer et al., 2005).	11
Figura 8	Fotomicrografia representativa de expressão de p16 (imunohistoquímica). Aumento de 10x.	32

Figura 9 Representação gráfica da estimativa da ancestralidade nos 43 grupos HPV (+) e HPV (-) apartir dos dados de genotipagem do painel de 46 marcadores.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação dos tipos de HPV de acordo com seu potencial carcinogênico	10
Tabela 2	Estadiamento clínico dos tumores de orofaringe HPV (+) AJCC UICC 8ª edição	15
Tabela 3	Estadiamento patológico dos tumores de orofaringe HPV (+) AJCC UICC 8ª edição	16
Tabela 4	Estadiamento clínico dos tumores de orofaringe HPV (-) AJCC UICC 8ª edição	17
Tabela 5	Estadiamento patológico dos tumores de orofaringe HPV (-) AJCC UICC 8ª edição	18
Tabela 6	Estudos de prevalência de HPV em tumores de orofaringe.	20
Tabela 7	Caracterização da positividade do HPV em relação às características epidemiológicas dos pacientes	37
Tabela 8	Comparação do IDH com a positividade ao HPV	38
Tabela 9	Dados do questionário relativos ao hábito de fumar, etilismo e comportamento sexual	39
Tabela 10	Modelo da Análise uni e multivariada de dados sociodemográficos e HPV	41
Tabela 11	Composição da Ancestralidade nos pacientes estudados	42
Tabela 12	Distribuição das Frequências das Ancestralidades de acordo com a positividade ao HPV	42
Tabela 13	Associação entre ancestralidade Africana e HPV	44
Tabela 14	Associação entre ancestralidade Europeia e HPV	44
Tabela 15	Associação entre ancestralidade Asiática e HPV	44
Tabela 16	Associação entre ancestralidade Ameríndia e HPV	44

LISTA DE ABREVIATURAS

AFR	Africana
AIMs	Ancestry-informative Markers
AME	Ameríndia
ASN	Asiática
CEC	Carcinoma espinocelular
CEP	Comitê de ética em pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucléico (do inglês: deoxyribonucleic acid)
EUA	Estados Unidos da América
EUR	Europeia
HAA	Hospital de Amor Amazônia
HAB	Hospital de Amor Barretos
HPV	Papiloma vírus Humano (do inglês: Human Papillomavirus)
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INDELS	Marcadores de Inserção/Deleção
PAIP	Programa de Auxílio e Incentivo ao Pesquisador
PCR	Reação por cadeia de polimerase (do inglês: Polymerase Chain Reaction)

REDCap	Research Electronic Data Capture
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VLP	Partícula semelhante a vírus (<i>VirusLikeParticles</i>)
vs	Versus

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de cabeça e pescoço é um importante problema de saúde pública. Nos EUA, os tumores de boca e faringe ocupam a oitava posição como causa mais comum de câncer. Em relação aos fatores de risco, o álcool e o tabagismo são considerados fatores importantes na carcinogênese desses tumores. Porém nas últimas décadas outro fator etiológico para o câncer de orofaringe vem sendo bastante estudado, que é o papilomavirus humano (HPV). A prevalência do HPV nos tumores de orofaringe varia de acordo com a época do estudo, da população estudada e da metodologia de análise. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil epidemiológico nos carcinomas espinocelulares de orofaringe, analisando a presença do HPV, encontradas em regiões distintas do Brasil.

MÉTODOS: Realizamos um estudo transversal com 252 pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular de orofaringe tratados em uma única instituição no período de 2014 a 2019. O status HPV foi determinado em todos os pacientes através da pesquisa da proteína p16 por imunohistoquímica. Dados demográficos (sexo, idade, estado civil) e clínico-patológicos (TNM, estágio clínico de acordo com a oitava edição da American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system) foram obtidos dos prontuários. Dos 252 pacientes do estudo, 125 responderam a um questionário sobre comportamento sexual e hábitos de tabagismo e etilismo. E em 40 pacientes do estudo foi realizado a pesquisa da ancestralidade genética. Após a obtenção do DNA das amostras selecionadas, a ancestralidade dos indivíduos incluídos no estudo foi determinada utilizando-se um painel de 46 marcadores informativos da ancestralidade (AIMs), constituídos por polimorfismos de inserção e deleção (INDELS). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Médica do Hospital de Câncer de Barretos sob número: 1.943.689.

RESULTADOS: 252 pacientes participaram da pesquisa, 221(87,7%) eram do sexo masculino, sendo 81(32,14%) HPV (+) e 171(67,85%) HPV (-). O carcinoma espinocelular de orofaringe HPV (+) foi mais comum em pacientes que nunca beberam, em pacientes que nunca fumaram, naqueles com maior nível educacional e foi associado a tumores que se apresentaram em estágio clínico inicial (I e II), e quando uma mulher tem um carcinoma espinocelular de orofaringe a sua probabilidade é maior de ser HPV (+). Em relação a ancestralidade genética, encontramos um predomínio do componente

Europeu (73,9%), seguido do Africano (12,6%) e um equilíbrio entre as proporções dos componentes Asiático (6,8%) e Ameríndio (6,7%). **CONCLUSÕES:** Os pacientes etilistas e tabagistas atuais tiveram uma menor chance de serem HPV (+). Sexo feminino e nível de escolaridade superior tiveram uma maior chance de ser HPV (+). Encontramos um predomínio da ancestralidade europeia, seguida da africana e um equilíbrio entre as proporções dos componentes asiático e ameríndio tanto no grupo HPV (+) como no grupo HPV (-).

Palavras chave:

Carcinoma de Células Escamosas Orofaríngeo; Carcinoma de Células Escamosas Oral; Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço; HPV; Papilomavírus Humano; Índice de Desenvolvimento Humano

ABSTRACT

INTRODUCTION: Head and neck cancer is an important public health problem. In the USA, tumors of the mouth and pharynx occupy the eighth position as the most common cause of cancer. Alcohol and smoking are considered important factors in the carcinogenesis of these tumors. However, in the last decades, another etiological factor for oropharyngeal cancer has been extensively studied, which is the human papillomavirus (HPV). The prevalence of HPV in oropharyngeal tumors varies according to the time of the study, the population studied and the methodology. Thus, the aim of this study was to evaluate the epidemiological profile in oropharyngeal squamous cell carcinomas, analyzing the presence of HPV, found in different regions of Brazil. **METHODS:** We carried out a cross-sectional study with 252 patients diagnosed with oropharyngeal squamous cell carcinoma treated at a single institution from 2014 to 2019. HPV status was determined in all patients by investigating the p16 protein by immunohistochemistry. Demographic (sex, age, marital status) and clinical-pathological (TNM, clinical stage according to the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system) data were obtained from medical records. Of the 252 patients in the study, 125 responded to a questionnaire about sexual behavior and smoking and drinking habits. And in 40 patients in the study, genetic ancestry research was carried out. After obtaining the DNA from the selected samples, the ancestry of the individuals included in the study was determined using a panel of 46 ancestral information markers (AIMs), consisting of polymorphisms insertion and deletion (INDELS). The study was approved by the Medical Ethics Committee of the Barretos Cancer Hospital under number: 1.943.689. **RESULTS:** 252 patients participated in the research, 221 (87.7%) were male, with 81 (32.14%) p16 (+) and 171 (67.85%) p16 (-). HPV (+) oropharyngeal squamous cell carcinoma was more common in patients who never drank, in patients who never smoked, in those with a higher educational level and was associated with tumors that presented in the initial clinical stage (I and II), and when a woman has an oropharyngeal squamous cell carcinoma is more likely to be HPV (+). Regarding genetic ancestry, we found a predominance of the EUR component (73.9%), followed by AFR (12.6%) and a balance between the proportions of the components ASN (6.8%) and AME (6.7%).

CONCLUSIONS: Current alcoholics and smokers were less likely to be HPV (+). Female gender and higher education level had a greater chance of being HPV (+). We found a predominance of European ancestry, followed by African ancestry and a balance between the proportions of the Asian and Amerindian components in both the HPV (+) and HPV (-) groups.

Key words:

Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma; Oral Squamous Cell Carcinoma; Head and Neck Squamous Cell Carcinoma; HPV; Human Papillomavirus; Human development Index

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia dos Tumores de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço é um importante problema de saúde pública. Segundo o GLOBOCAN 2018¹ o câncer de cavidade oral é o oitavo câncer mais comum no mundo, representando 2 % (354.864) do total de novos casos de câncer.

Nos EUA, os tumores de boca e faringe ocupam a oitava posição como causa mais comum de câncer. As estimativas para o ano de 2019 apontam para 53.000 novos casos de câncer de cavidade oral e faringe diagnosticados ao ano, com a previsão de 38.140 novos casos em homens e 14.860 novos casos em mulheres².

Segundo o INCA (2019) no Brasil, a estimativa para o ano de 2020 é de 11.180 novos casos de câncer de cavidade oral em homens e de 4.010 em mulheres³.

O câncer de cabeça e pescoço corresponde às patologias malignas que acometem a cavidade oral, orofaringe, laringe, hipofaringe, rinofaringe, glândulas salivares, seios paranasais, cavidade nasal, tireoide, paratireoide e pele, sendo que os tumores de tireoide, paratireoides e pele são normalmente estudados separadamente devido a aspectos epidemiológicos peculiares⁴. Ou seja correspondem principalmente aos cânceres que acometem o trato aéreo digestivo alto (Figura 1).

O foco do nosso estudo é a região da orofaringe que corresponde a base da língua, tonsilas palatinas, pilares amigdalianos e parede posterior (Figura 1).

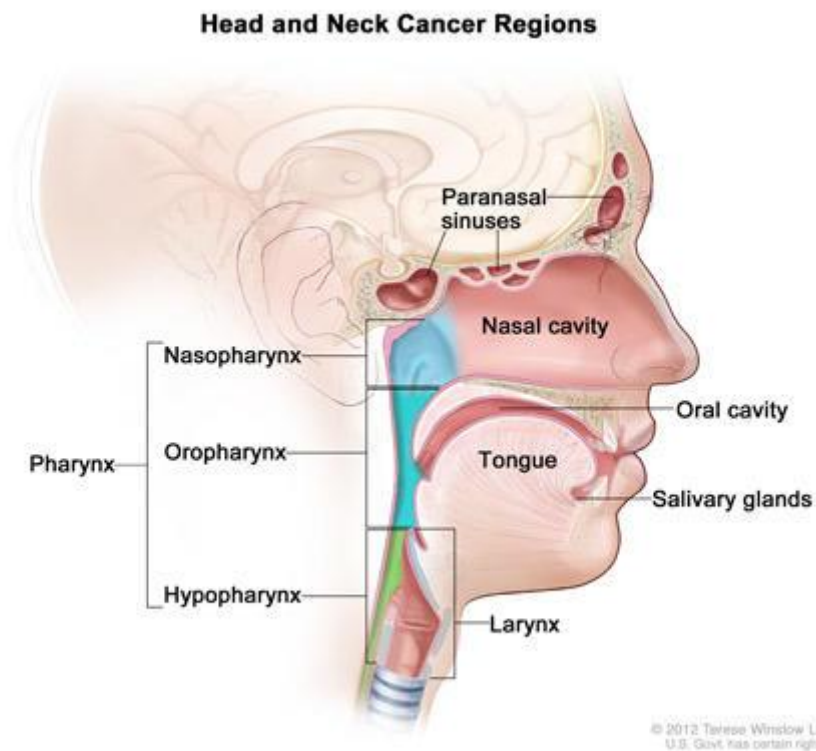


Figura 1 – Regiões da cabeça e pescoço. Disponível em: <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2016/fda-pembrolizumab-hnsc>. Créditos: Terese Winslow.

Em relação aos fatores de risco, o álcool e o tabagismo são considerados os fatores mais importantes na carcinogênese dos tumores de cabeça e pescoço⁵.

Um trabalho publicado em 2007 de Iglesias et al. demonstra que ao longo das décadas houve diminuição do hábito do tabagismo na população como apresentado na Figura 2⁶.

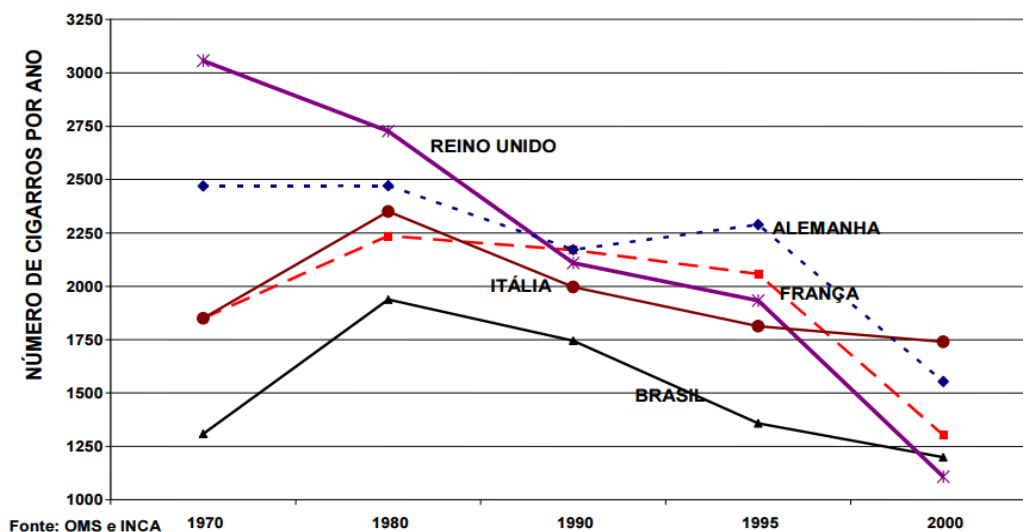


Figura 2 - Consumo de Cigarros per Capita em alguns países da União Europeia e no Brasil, 1970- 2000 Incluindo o Consumo Ilegal. Dados expressos em número de cigarros consumido por ano, *per capita* (Iglesias *et al.*, 2007)⁶.

Assim com a diminuição do principal agente causal dos tumores de cabeça e pescoço era de se esperar uma diminuição consequente de sua incidência. Isto aconteceu com as incidências dos cânceres de boca, laringe e hipofaringe que a partir da década de 80 têm diminuído. Por outro lado a incidência dos tumores de orofaringe vem aumentando⁷.

Chaturvedi *et. al.* estudaram 271 pacientes com tumores de orofaringe e observaram um aumento da incidência deste tipo de câncer de 1984 a 2004. Observaram, também, um aumento na incidência de tumores HPV (+). A incidência de tumores HPV (+) de orofaringe aumentou de 16,3% durante a década de 80 para 72,7% durante os anos 2000 (Figuras 3 e 4)⁷.

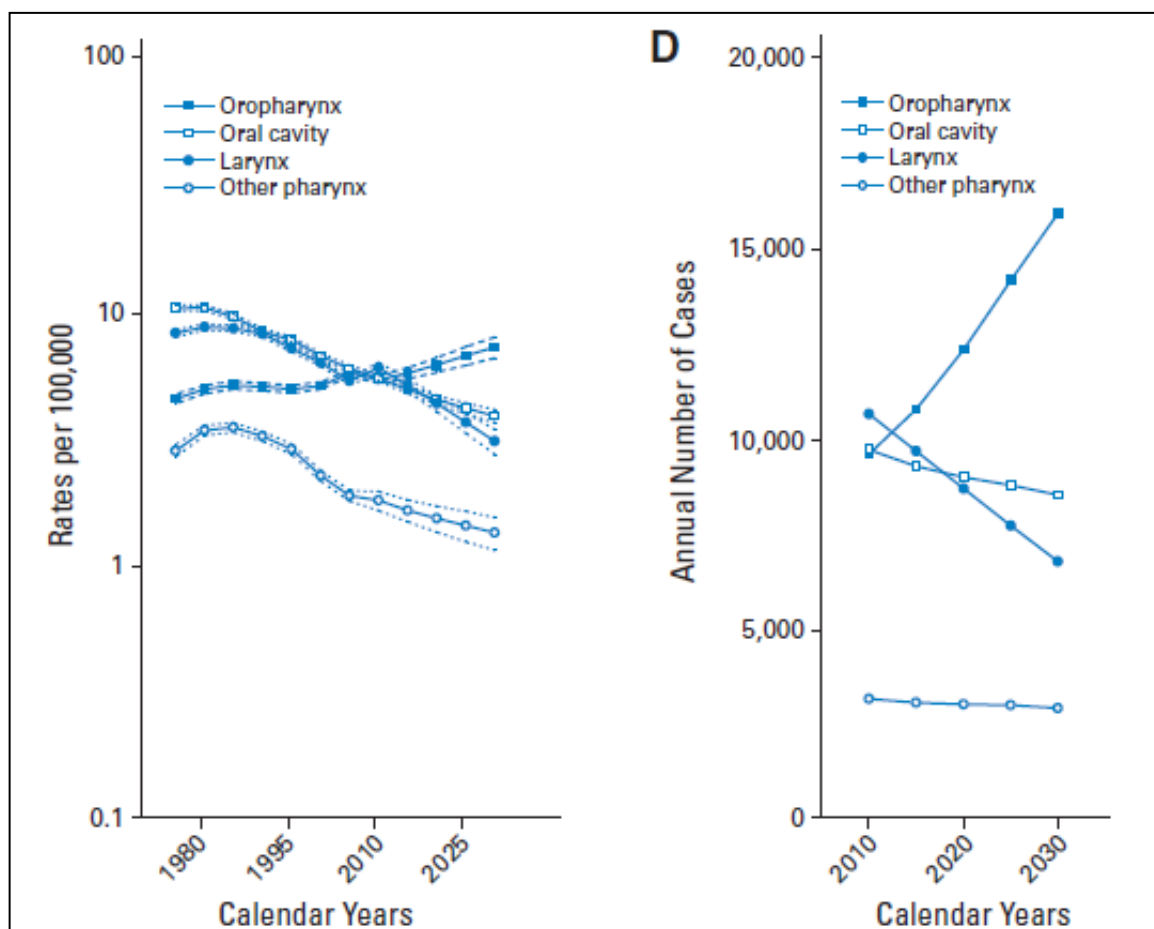


Figura 3 – A - Incidência observada e projetada para câncer de orofaringe, cavidade oral, laringe e outros sítios de faringe; B – Número de casos projetados para cânceres de orofaringe, cavidade oral, laringe e outros sítios de faringe até o ano de 2030 (Chaturvedi et. al. 2011)⁷.

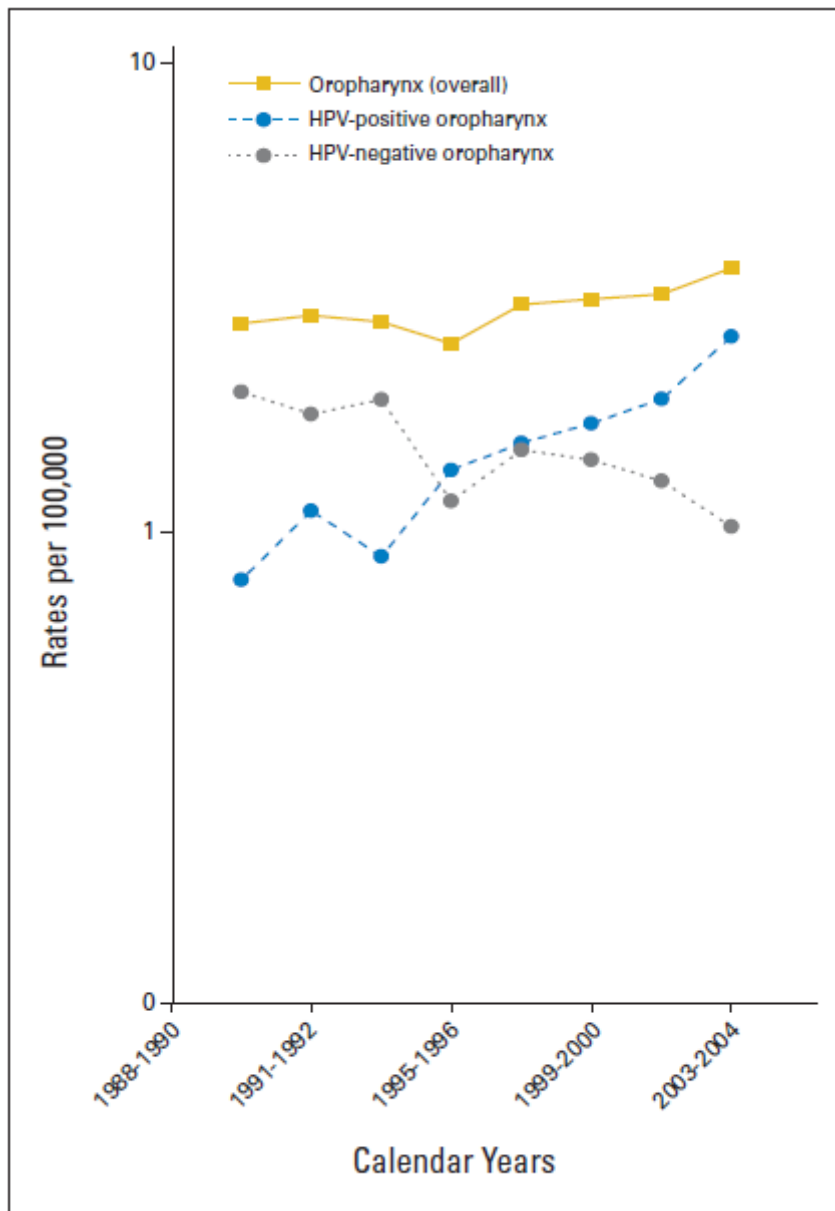


Figura 4 –Incidência de câncer de orofaringe: geral, HPV positivo e HPV negativo 1988 - 2004 em Hawaii, Iowa e Los Angeles (Chaturvedi et. al. 2011)⁷.

1.2 Biologia do HPV

O Papiloma vírus humano representa a infecção sexualmente transmissível viral mais frequente no mundo^{8,9}.

As infecções por HPV são transmitidas principalmente através do contato direto da pele-a-pele ou pele-mucosa. O número de parceiros sexuais tem sido reiteradamente demonstrado como a principal condição determinante da infecção HPV anogenital, tanto em homens e mulheres⁸.

Os papilomavírus são pequenos vírus não envelopados de estrutura icosaédrica de aproximadamente 50-60 nm de diâmetro, contendo uma cadeia dupla circular de genoma de DNA. Os papilomas vírus humano pertence à família Papillomaviridae, gênero Papilomavírus⁸.

Os oito tipos de Papilomavírus mais comuns em todo o mundo são: HPV 16, 18, 31, 33, 35, 45, 52, e 58. Sendo o tipo 16 o mais comumente encontrado, seguido do 18 em diversas partes do mundo^{8,9}.

O HPV está relacionado com algumas neoplasias malignas, especialmente os cânceres da região anogenital: vulva, anus, pênis, colo do útero e os da região da cabeça e pescoço.

O genoma do HPV possui oito regiões conhecidas como fases de leitura aberta e uma região não-codificadora. As fases de leitura aberta são organizadas em três regiões: a região precoce (genes E1, E2, E4, E5, E6, E7), a região tardia (genes L1 e L2), e região controladora (URR), como mostra a figura 5^{8,9}.

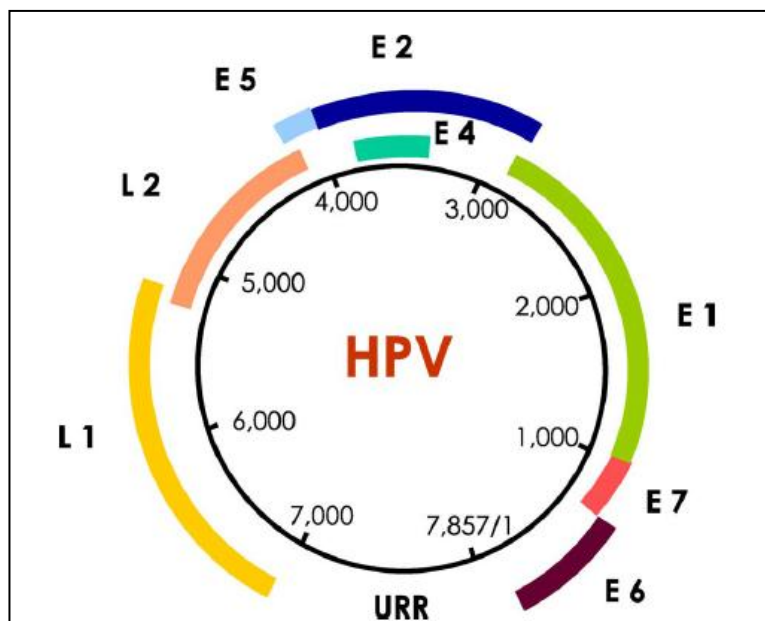


Figura 5 - Representação do genoma do HPV (Muñoz et al., 2006)⁹

O poder carcinogênico do HPV é atribuído a duas proteínas virais, E6 e E7, que são capazes de interagir com algumas proteínas que regulam o ciclo celular e que atuam como supressoras dos tumores, como a p53 e pRb. Essa interação provoca a degradação e inativação das proteínas celulares, o que conduziria potencialmente a transformação e posteriormente, a formação dos tumores malignos (Figura 6)¹⁰.

As proteínas E6 dos HPVs de alto risco promovem a degradação da proteína supressora de tumor p53. Essa degradação compromete a habilidade da célula hospedeira de realizar as checagens do ciclo celular e induzir a apoptose¹¹. As proteínas E7 dos HPVs de alto risco inibem a atividade da proteína do retinoblastoma (pRB) que é supressora tumoral. A interação do E7 com a proteína do retinoblastoma hipofosforilada induz também a proliferação celular¹¹.

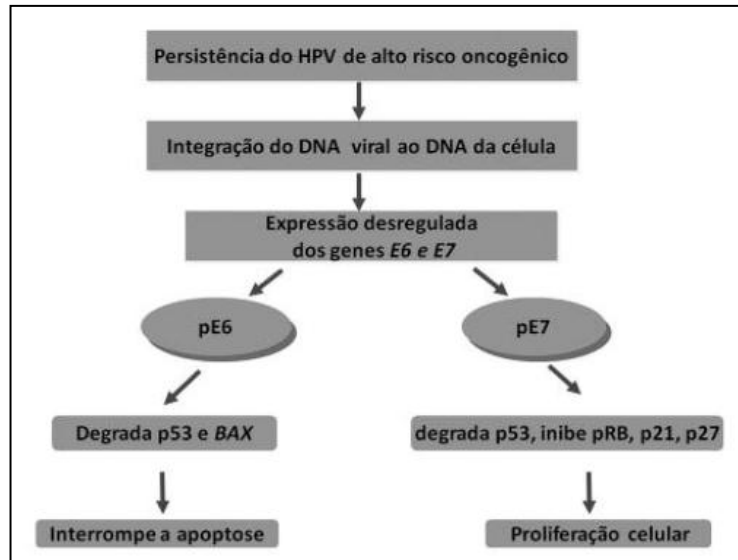


Figura 6 - Principal atuação das proteínas virais sobre o ciclo celular (Ferraz, 2012)¹⁰.

Quando o E7 inibe pRB há como consequência a superexpressão de P16INK4a. A p16 é resultado da atividade de genes de uma região do braço curto do cromossomo 9, banda 21 (9p21), onde se localiza o locus *INK4b-ARF-INK4a*, que codifica dois inibidores de ciclina dependente de quinase: p15INK4b e P16INK4a. Como consequência, carcinomas de células escamosas de orofaringe associados ao HPV apresentam superexpressão nuclear e citoplasmática de P16INK4a, que é predominantemente ausente neste tipo de tumor HPV negativo¹².

1.3 Proteína p16 e sua relação com o HPV

O p16 é uma proteína de 156 aminoácidos, que é um importante regulador do ciclo celular. Ela é codificada pelo gene *CDKN2*, também referido como *INKA4*, que é um gene supressor de tumor, localizado no cromossomo humano 9p21^{13,14}.

A presença da proteína p16 tem sido relacionada com a infecção de células pelo HPV de alto risco. Assim a detecção da superexpressão da proteína p16 por imuno-histoquímica pode ser usada como um marcador, indicando a infecção por HPV^{13,14}.

As vantagens de fazer a pesquisa da hiperexpressão do p16 por imunohistoquímica é uma forma prática, simples e de baixo custo para detectar o HPV^{13,14}.

Vários guidelines importantes no mundo como o National Comprehensive Câncer Network (NCCN) preconizam a utilização clínica da pesquisa do p16 por imunohistoquímica para caracterização dos casos como HPV (+) ou HPV (-)^{13,14}. E também o próprio estadiamento dos tumores de orofaringe mudou na 8ª edição da AJCC assim consequentemente o seu prognóstico.^{15,16}

Um dos estudos que compara o uso do p16 com outros métodos de detecção do HPV foi o estudo de Singhi e Westra (2010)¹⁷ onde a hibridização in situ foi realizada em conjunto com a pesquisa do p16 por imuno-histoquímica em 256 pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Um total de 182 tumores de 256 (71,2%) era de HPV16-positivo em que a grande maioria (87%) era tumores de orofaringe. Neste estudo, todos os casos de HPV16 positivo apresentaram a pesquisa de p16 positivas, enquanto que os p16 positivos estavam presentes em 19 dos 80 (24%) tumores HPV16-negativo, dos quais 6 poderiam ser explicados pela presença de outros subtipos de HPV. Os resultados deste estudo correspondem a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo da expressão de p16 em relação ao estado do HPV de 100%, 74%, 91% e 100%, respectivamente.

1.4 Dados epidemiológicos do HPV

Em relação à prevalência do HPV na população em geral, Gillison et al. pesquisaram a presença do vírus HPV em mucosa oral de 5579 indivíduos, mostrando uma prevalência de 6,9%, sendo maior em homens do que em mulheres¹⁸.

Um outro estudo procurou a presença de HPV através de enxágüe bucal de pacientes com câncer de orofaringe associado ao HPV. Foi detectada a presença do HPV em 65 % dos casos. Entre os parceiros dos pacientes foi identificada incidência de HPV em 4%. Estes achados sugerem que a maioria dos parceiros conseguem eliminar o vírus quando exposto¹⁹.

Mais de 150 tipos de HPV já foram identificados. Munoz em 2003 classificou os tipos de HPV de acordo com o seu potencial carcinogênico²⁰ (Tabela 1).

Tabela 1- Classificação dos tipos de HPV de acordo com seu potencial carcinogênico

Risco	Tipo de HPV
Baixo risco	6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CPC6108
Alto risco	16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82
Provavelmente carcinogênicos (MUNOZ, 2003) ²⁰	26, 53 e 66

A Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer– IARC, 2009)⁸ classificou os tipos de HPV de acordo com seu poder carcinogênico como nos exemplos abaixo:

Grupo 1(carcinogênicos para humanos): HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51,52, 56, 58 e 59.

Grupo 2A(provavelmente carcinogênicos para humanos): HPV 68.

Grupo 2B(possivelmente carcinogênicos para humanos): HPV 26, 53, 66,67, 70, 73 e 82.

Grupo 3(não carcinogênicos): HPV 6 e 11.

HPV 16 está presente em aproximadamente 90% dos tumores de orofaringe HPV (+).

Em uma metanálise realizada por Kreimer et al. (2005), a positividade ao HPV foi encontrada em 35,6% dos casos dos tumores de orofaringe e o tipo 16 foi encontrado em 30,9% (86,8% dos positivos). O tipo 18 foi encontrado em apenas 1,0% dos tumores e o tipo 6 em 2,5% dos tumores (Figura 7)²¹.

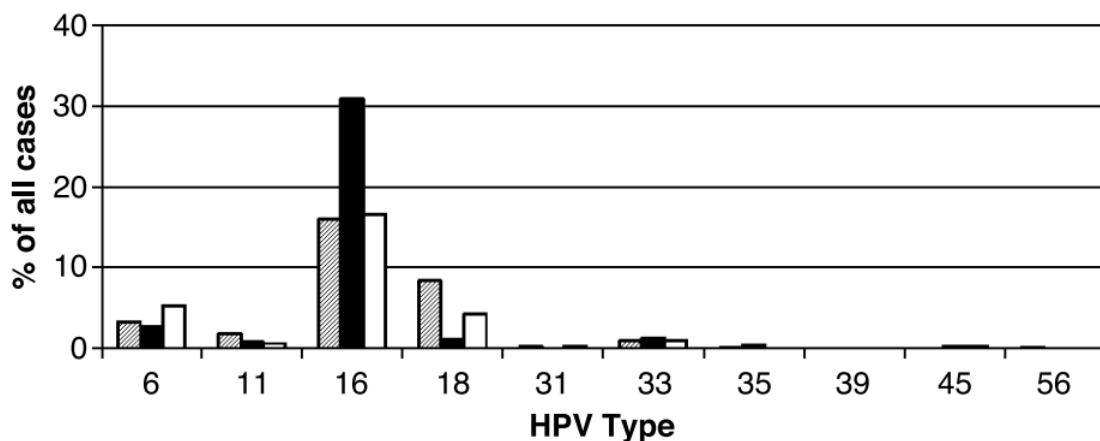


Figura 7 - Prevalência específica por tipo de HPV em um total de 2642 carcinomas espinocelulares (CECs) de cavidade oral, 969 de orofaringe, 1435 de laringe. Colunas com linhas diagonais representam CECs de cavidade oral; colunas pretas de orofaringe; colunas brancas de laringe. Laringe inclui também os tumores de hipofaringe (Retirado de Kreimer et al., 2005)²¹.

1.5 Métodos de diagnóstico do HPV

Os métodos de diagnóstico do HPV se resume em dois métodos:

- a) Detecção do DNA ou RNA viral
- b) Detecção de marcadores celulares

Para a detecção do DNA viral os testes mais comumente utilizados são: teste de “hibridização in situ”, captura híbrida e reação em cadeia de polimerase (PCR)²².

O teste de hibridização “in situ” é a técnica mais sensível para detectar o HPV²².

A captura híbrida é o exame mais moderno para fazer o diagnóstico de HPV. Este é o único teste aprovado pelo FDA para o diagnóstico laboratorial de infecção por HPV na clínica do dia-a-dia²².

O exame de PCR tem sido utilizada principalmente em pesquisas, especialmente como um teste padrão ouro para comprovar a existência ou não de infecção por HPV⁸.

Não há diferenças significativas nas taxas de prevalência de HPV pelo PCR ou pela hibridização “in situ” nos casos de câncer de orofaringe. Porém PCR detecta maior quantidade de casos de HPV do que a hibridização “in situ”.

Um dos marcadores mais frequentemente utilizados nos estudos do câncer de orofaringe é o p16, uma oncoproteína detectada por método imunohistoquímico, e como mencionado anteriormente, relacionada à atividade do HPV²³.

A expressão do p16 não é limitada aos tumores HPV (+), e usando apenas este marcador como um indicador de infecção pelo HPV teremos inevitavelmente um risco de incluir alguns resultados falso positivos²⁴.

O status HPV ou o status do p16 podem ser usados como marcadores da infecção pelo HPV, dependendo do protocolo de cada instituição¹⁴.

Em um estudo multi institucional realizado com 316 pacientes com câncer de orofaringe que foram submetidos tanto à pesquisa do p16 por imunohistoquímica como para pesquisa do HPV por hybridização in situ. Dez por cento dos positivos para o p16 eram negativos para o HPV, e sete por cento dos negativos para o p16 eram positivos para HPV¹⁴.

A sensibilidade do p16 por imunohistoquímica pode ser baixa nos aspirados de punção por agulha fina²⁵.

D’Souza e colaboradores ao analisarem 100 casos de câncer de orofaringe comparando com 200 casos controles encontraram resultados divergentes quanto à positividade dos exames para detecção do vírus. Nos 100 indivíduos com câncer de orofaringe foram identificados o DNA do vírus HPV tipo 16 por PCR em 72% dos casos. A positividade aos testes sorológicos para as oncoproteínas E6, E7, ou ambas, foi de 64%. No grupo controle apenas 4% das amostras eram positivas para os testes sorológicos.²⁴

1.6 Relação do HPV com o câncer de cabeça e pescoço

Os fatores de risco mais importantes para o câncer de cabeça e pescoço são o tabagismo e o etilismo. Porém, muitos pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe não tem nenhum destes fatores de risco tradicionais relacionados com o câncer de cabeça e pescoço. Muitos estudos epidemiológicos assim como moleculares tem correlacionado o HPV principalmente o tipo 16 como agente etiológico em muitos desses pacientes²⁶

A história natural da infecção pelo HPV na região de cabeça e pescoço não está bem esclarecida; porém, sabe-se que o HPV encontra-se presente em regiões de mucosa de cabeça e pescoço em uma cerca de 7% dos indivíduos sadios.¹⁸

Em 2007, a Agência Internacional para Pesquisa sobre o Câncer (IARC) concluiu que existem evidências suficientes para considerar a carcinogenicidade do HPV na cavidade oral e orofaringe, enquanto existem evidências limitadas para considerar a carcinogenicidade pelo HPV na laringe.⁸

Vários estudos apontam o HPV do tipo 16 como o agente etiológico em muitos desses pacientes com câncer de cabeça e pescoço. O HPV 16 está presente em 90% dos casos de HPV (+).^{8, 18, 24}.

Mehanna et. al. encontraram um aumento da incidência de HPV nos cânceres de orofaringe ao longo dos anos: de 40,5% antes de 2000, para 64,3% entre 2000 a 2004 e 72,2 % entre 2005 a 2009.²⁷ Esses autores encontraram também um aumento significativo da prevalência na América do Norte e na Europa. E a significativa diferença que existia anteriormente no ano de 2000 (50,7% VS 35,3% respectivamente agora desapareceu (69,7 vs 73,1%). Eles não evidenciaram, entretanto, um aumento da prevalência em tumores não orofaringe ao longo das décadas.²⁷

Estudos da década de 90 sugerem que aproximadamente 50% dos cânceres de orofaringe estavam relacionados ao HPV, enquanto estudos mais recentes demonstram uma relação de 70 a 80 % do HPV com os cânceres de orofaringe na Europa e na América do Norte.²⁸

Auluck et al. ao estudarem pacientes diagnosticados com câncer de cavidade oral e de orofaringe entre 1980 e 2006 acharam também uma diminuição na incidência de câncer de cavidade oral e aumento de câncer de orofaringe. Eles consideraram que para os efeitos da diminuição do tabagismo agirem sobre a incidência de câncer, pode ser necessário um período de latência de cerca de 25 anos.²⁹

Um fator relacionado a esse aumento dos casos de cânceres de orofaringe é a mudança em relação ao comportamento sexual. D'Souza et al. relacionaram o sexo oral e o beijo como fatores de risco para a infecção pelo HPV na cavidade oral / orofaringe.³⁰

Mais de quatro parceiros na vida onde praticaram o sexo oral e mais de 6 parceiros sexuais ao longo da vida foram considerados como fatores de risco para câncer de orofaringe.³¹

D'Souza et al. consideraram como um número de parceiros sexuais (sexo vaginal) acima de 26 em toda a vida e mais de 6 parceiros que fizeram sexo oral como fatores de risco para o carcinoma espinocelular de orofaringe.³

Estudos recentes sugerem que o HPV está relacionado com 70 a 80% dos casos de câncer de orofaringe nos EUA e na Europa.^{7, 27} Além disso, a incidência de câncer de orofaringe em homens jovens vem aumentando nos países desenvolvidos.⁷

Observou-se, ainda, uma forte associação entre o câncer de orofaringe e os níveis sorológicos dos anticorpos contra o HPV e a presença de infecção oral pelo HPV. Em estudo de D'Souza et al., 64 % dos pacientes eram positivos para E6 ou E7 nos testes sorológicos contra 4 % do grupo controle; além de serem detectados infecção por HPV oral em 37% dos pacientes contra 6% dos casos controles.²⁴

Em relação ao intervalo de tempo entre a exposição ao HPV e ao desenvolvimento do câncer de orofaringe excede possivelmente mais de 10 anos.³²

Os HPVs tipos 6 e 11 estão relacionados com a papilomatose laríngea recorrente e há muito tempo tem-se sugerido sua associação com o câncer de laringe.⁸

Em relação ao câncer de boca, hoje temos evidências sólidas sobre o papel do HPV 16 na carcinogênese do câncer de boca, mas evidências limitadas em relação ao HPV 18.⁸

1.7 Estadiamento dos tumores de orofaringe

O'Sullivan et al. estudaram 1246 pacientes com câncer de orofaringe HPV (+) e observaram que a taxa de sobrevida em 5 anos foi similar nos pacientes classificados pela 7ª edição do TNM de estágio I,II,III e IVA (respectivamente; 88%; 82%; 84% e 81%, mas foi menor no estágio IVB 60%²⁸. Assim como o prognóstico era semelhante nestes estádios dos tumores HPV (+), não era adequado utilizar o mesmo estadiamento para tumores HPV (+) ou (-). Logo foi proposto um novo estadiamento para o câncer de orofaringe HPV (+) diferente do HPV (-) que foi descrito na 8ª edição do TNM. (tabelas 2,3,4 e 5)

Tabela 2 – Estadiamento clínico dos tumores de orofaringe HPV (+) AJCC UICC 8ª edição

Tumor primário (T)			
Categoria T	Critérios T		
T0	Tumor primário não foi localizado		
T1	Tumor ≤ 2cm nas maiores dimensões		
T2	Tumor > 2cm e ≤ 4cm nas maiores dimensões		
T3	Tumor > 4cm nas maiores dimensões ou extensão para a superfície lingual da epiglote		
T4	Tumor invade a laringe, musculatura extrínseca da língua, músculo pterigoide medial, palato duro ou mandíbula, ou além dessas estruturas.		
Linfonodos regionais (N)			
Categoria N	Critérios N		
NX	Linfonodos cervicais não podem ser avaliados		
N0	Ausencia de metástase linfonodal cervical		
N1	Um ou mais linfonodos ipsilateral, todos menores que 6 cm		
N2	Linfonodos contralateral ou bilateral, todos menores que 6 cm		
N3	Linfonodo maior ou = que 6 cm		
Metástase a distância (M)			
Categoria M	Critério M		
M0	Sem metástase a distância		
M1	Metástase a distância		
TNM (agrupamento clínico)			
T	N	M	Grupo de estadiamento
T0, T1, or T2	N0 or N1	M0	I
T0, T1, or T2	N2	M0	II
T3	N0, N1, or N2	M0	II
T0, T1, T2, T3, or T4	N3	M0	III
	N0, N1, N2, or N3	M0	III
T4		M0	III
Qualquer T	Qualquer N	M1	IV

Fonte: Adaptado do AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed^{15, 16}

Tabela 3– Estadiamento patológico dos tumores de orofaringe HPV (+) AJCC UICC 8ª edição

Tumor primário (T)			
Categoria T	Critérios T		
T0	Sem evidências do tumor primário		
pT1	Tumor ≤ 2cm nas maiores dimensões		
pT2	Tumor > 2cm e ≤ 4cm nas maiores dimensões		
pT3	Tumor > 4cm nas maiores dimensões ou extensão para superfície lingual da epiglote		
pT4	Tumor invade a laringe, musculatura extrínseca da língua, músculo pterigoide medial, palato duro ou mandíbula		
Linfonodos regionais (N) – Patológico N (pN)			
Categoria N	Critérios N		
NX	Linfonodos cervicais não podem ser acessados		
pN0	Nenhuma linfonodomegalia cervical		
pN1	Metástase em 4 ou menos linfonodos cervicais		
pN2	Metástase em mais de 4 linfonodos		
Metástase a distância (M)			
Categoria M	Critério M		
M0	Sem metástase a distância		
M1	Metástase a distância		
TNM (Agrupamento patológico)			
T	N	M	Grupo de estadiamento
T0, T1, ou T2	N0, N1	M0	I
T0, T1, ou T2	N2	M0	II
T3 ou T4	N0, N1	M0	II
T3 ou T4	N2	M0	III
Qualquer T	Qualquer N	M1	IV

Fonte: Adaptado do AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed ^{15, 16}

Tabela 4 – Estadiamento clínico dos tumores de orofaringe HPV (-) AJCC UICC 8ª edição

Tumor primário (T)			
Categoria T	CrITÉRIOS T		
T0	Sem evidências do tumor primário		
T1	Tumor ≤ 2cm nas maiores dimensões		
T2	Tumor > 2cm e ≤ 4cm nas maiores dimensões		
T3	Tumor > 4cm nas maiores dimensões ou extensão para superfície lingual da epiglote		
T4a	Tumor invade a laringe, musculatura extrínseca da língua, músculo pterigoide medial, palato duro ou mandíbula		
T4b	Tumor invade o músculo pterigóideo lateral, lâminas pterigóideas, parede lateral da nasofaringe, base de crânio ou encarcera a carótida.		
Linfonodos regionais (N) – Patológico N (pN)			
Categoria N	CrITÉRIOS N		
NX	Linfonodos cervicais não podem ser acessados		
N0	Nenhuma metástase linfonodal cervical		
N1	Metástases em um único linfonodo ipsilateral, com 3 cm ou menos em seu maior diâmetro. Sem extravasamento extracapsular		
N2a	Metástase em um único linfonodo ipsilateral maior que 3 cm e menor que 6 cm em sua maior dimensão e sem extravasamento extracapsular;		
N2b	Metástases em múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum maior que 6 cm em seu maior diâmetro e sem extravasamento extracapsular;		
N2c	Linfonodos bilateral ou contralateral, < ou = 6 cm em seu maior diâmetro e sem extravasamento extracapsular		
N3a	Metástase em um linfonodo maior que 6 cm em seu maior diâmetro e sem extravasamento extracapsular		
N3b	Metástase em qualquer linfonodo e clinicamente com extravasamento extracapsular.		
Metástase a distância (M)			
Categoria M	CrITÉRIO M		
M0	Sem metástase a distância		
M1	Metástase a distância		
Grupos de estadiamento prognóstico - clínico			
T	N	M	Grupo de estadiamento
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	I
T2	N0	M0	II
T3	N0	M0	III
T1,T2,T3	N1	M0	III
T4a	N0,N1	M0	IVA
T1.T2.T3,T4a	N2	M0	IVA
Qualquer T	N3	M0	IVB
T4b	Qualquer N	M0	IVB
Qualquer T	Qualquer N	M1	IVC

Fonte: Adaptado do AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed ^{15, 16}

Tabela 5 – Estadiamento patológico dos tumores de orofaringe HPV (-) AJCC UICC 8ª edição

Tumor primário (T)			
Categoria T	Critérios T		
T0	Sem evidências do tumor primário		
pT1	Tumor ≤ 2cm nas maiores dimensões		
pT2	Tumor > 2cm e ≤ 4cm nas maiores dimensões		
pT3	Tumor > 4cm nas maiores dimensões ou extensão mucosa para superfície lingual da epiglote		
pT4a	Tumor invade a laringe, musculatura extrínseca da língua, músculo pterigoide medial, palato duro ou mandíbula		
pT4b	Tumor invade o músculo pterigóideo lateral, lâminas pterigóideas, parede lateral da nasofaringe, base de crânio ou encarcera a carótida.		
Linfonodos regionais (N) – Patológico N (pN)			
Categoria N	Critérios N		
NX	Linfonodos cervicais não podem ser acessados		
pN0	Nenhuma linfonodomegalia cervical		
pN1	Metástases em um único linfonodo ipsilateral, < ou =3 cm. Sem extravasamento extracapsular		
N2a	Metátase em um único linfonodo ipsilateral < ou =3 cm e com extravasamento extracapsular; ou um único linfonodo ipsilateral > 3 cm e < 6 cm sem extravasamento extracapsular;		
N2b	Metástases em múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum maior que 6 cm em seu maior diâmetro e sem extravasamento extracapsular;		
N2c	Linfonodos Bilateral ou contralateral, nenhum deles > 6 cm e sem extravasamento extracapsular		
N3a	Metástase em um linfonodo maior que 6 cm em seu maior diâmetro e sem extravasamento extracapsular		
N3b	Linfonodo ou linfonodos com extravasamento extracapsular		
Metástase a distância (M)			
Categoria M	Critério M		
M0	sem metástase a distância		
M1	metástase a distância		
Grupos de estadiamento prognóstico – patológico			
T	N	M	Grupo de estadiamento
Tis	N0	M0	0
T1	N0	M0	I
T2	N0	M0	II
T3	N0	M0	III
T1, T2, T3	N1	M0	III
T4a	N0, N1	M0	IVA
T1, T2, T3, T4a	N2	M0	IVA
Qualquer T	N3	M0	IVB
T4b	Qualquer N	M0	IVB
Qualquer T	Qualquer N	M1	IVC

Fonte: Adaptado do AJCC Cancer Staging Manual, 8th ed^{15, 16}

1.8 Prevalência do HPV nos tumores de orofaringe

Em relação à prevalência do HPV nos cânceres de orofaringe, os trabalhos não são padronizados quanto à metodologia; assim, vários autores encontraram diferentes taxas de prevalência. Além disso, a prevalência parece depender da população estudada e de seus hábitos culturais. Kreimer et al., (2005) ²¹ descreveram uma taxa de positividade de 35,6% ao avaliarem 969 tumores de orofaringe originados de 60 estudos em todo o mundo.

Na tabela 6 observa-se os principais trabalhos demonstrando a prevalência dos tumores de orofaringe.

Tabela 6- Estudos de prevalência de HPV em tumores de orofaringe.

Autor	Período	N	País	Prevalência
Países em desenvolvimento				
López et al., 2014 ³³	1998-2008	91	Brasil	6,6%
Anantharaman 2017 ³⁴	2002-2011	171	Brasil	4,1%
Petito, 2017 ³⁵	2005-2007	82	Brasil	25,6
Pinã, 2016 ³⁶	Não informado	13	Brasil	35%
Cantarutti, 2014 ³⁷	2005-2011	13	Brasil	38,5%
Bahl, 2014 ³⁸	2010-2011	105	India	22,8%
Países desenvolvidos				
Anantharaman, 2017 ³⁴	2002-2005	119	Europa	31,1
Nasman, 2009 ³⁹	2003-2007	98	Suécia	79,0
Chaturvedi et al., 2011 ⁷	1984-2004	271	EUA	44,1%
Anantharaman, 2017 ³⁴	2002-2006	243	EUA	59,3
D'Souza et al., 2007 ²⁴	2000-2005	100	EUA	72%
Vários países				
Herrero et al., 2003 ⁴⁰		142	9 países	18,3

Observa-se que a incidência do HPV nos tumores de orofaringe é variável de acordo com a população estudada e a metodologia aplicada na sua detecção.

Prevalência do HPV em Países em desenvolvimento

A maioria dos trabalhos envolvendo populações de países em desenvolvimento apresentam baixas incidências de HPV nos tumores de orofaringe.

López e colaboradores estudaram 91 pacientes no Brasil e encontraram uma incidência de 6,6%³³.

Anantharaman³⁴ em 2017 comparou casos dos EUA, Europa e Brasil encontrando em 171 casos do Brasil uma incidência de apenas 4,1%.

Petito³⁵ em 2017 estudando 82 casos no Brasil encontrou uma incidência de 25,6 %.

Outro estudo recente em país em desenvolvimento foi o de Bahl³⁸ que encontrou na Índia uma incidência de 22,8% de HPV nos tumores de orofaringe.

Prevalência do HPV em Países desenvolvidos

Selecionamos 3 artigos com casuísticas dos EUA Chaturvedi et al., 2011⁷, Anantharaman, 2017³⁴ e D'Souza et al., 2007²⁴ que encontraram incidências de 44,1%, 59% e 72% respectivamente. O trabalho de Chaturvedi et al., 2011⁷ traz uma casuística mais antiga (1984-2004) o que justifica a menor incidência identificada entre estes 3 trabalhos selecionados.

Anantharaman³⁴ em seu estudo comparando EUA, Europa e Brasil encontrou uma incidência de HPV em 31,1% nos pacientes europeus com câncer de orofaringe.

Nasman³⁹ estudando 98 pacientes com câncer de orofaringe na Suécia encontrou uma incidência de HPV de 79%.

1.9 Características clínicas dos tumores de cabeça e pescoço relacionados ao HPV

Os tumores de orofaringe relacionados com o HPV apresentam algumas características específicas. Normalmente os pacientes são mais jovens (em torno de 40 anos de idade)^{7, 28}. Os tumores de orofaringe HPV (+) tem uma grande predominância no sexo masculino, No estudo ICON-S, 84 por cento dos pacientes eram do sexo masculino e entre os HPV (-) 76 por cento eram do sexo masculino²⁸. A localização é predominante nas tonsilas ou na base da língua. Apresentam um tumor inicial T1-T2 associado a metástase cervical avançada N2-N3. Outra característica das metástases desses tumores é a sua apresentação cística^{7, 18 28}.

Posner et al. ao analisarem 111 pacientes com cancer de orofaringe identificou que os pacientes HPV foram significativamente mais jovens (54 contra 58 anos) e eram diagnosticados com tumores iniciais, 49 % dos HPV (+) eram T1 ou T2, já os HPV negativos apenas 20% tinham tumores iniciais⁴¹.

Gillison et al. realizaram um estudo com 240 pacientes diagnosticados como câncer de orofaringe no Johns Hopkins Hospital , quando foram separados em 2 grupos, positivos para HPV pela hibridização “in situ” e grupo dos negativos. O HPV foi detectado em 92 dos 240 casos. Comparativamente com os pacientes com tumores HPV negativos, pacientes com HPV (+) eram jovens (idade média de 54 anos VS 58 anos), maior predomínio de brancos, mais anos de estudo, casados e maior renda familiar¹⁸.

1.10 HPV e prognóstico

Além dessas características clínicas, os tumores de orofaringe HPV (+) apresentam um melhor prognóstico^{23, 42, 43}.

Ang et al. estudaram 323 pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de orofaringe estágio III e IV. Eles realizaram a pesquisa do DNA do vírus por hibridização e a pesquisa do p16 por imunohistoquímica. Dos 323 pacientes, 206 (63,8%) eram HPV positivos. A sobrevida em três anos foi de 82,4% no grupo do HPV (+) e de 57,1% no grupo HPV negativo, e a taxa livre de doença em três anos foi de 73,7% no grupo HPV (+) e de 43,4% no grupo HPV negativo⁴⁴.

O estudo também mostrou uma sobrevida em três anos de 83,6% para o grupo HPV (+) e de 51,3% para o grupo HPV (-). Sendo que a taxa livre de doença em 3 anos foi de 74% para o grupo HPV (+) e de 38,4% para o grupo HPV (-)⁴⁴.

No estudo de Ang e colaboradores pode-se notar uma boa correlação da presença de DNA do HPV e da expressão do p16⁴⁴.

Lassen et al. ²³ estudaram 156 pacientes com tumores em faringe e laringe supraglótica; 35 pacientes (22%) foram positivos para o p16. O controle locorregional do grupo p16 + em cinco anos foi de 58% versus 28% no grupo p16 negativo. A sobrevida específica para a doença foi de 72 % no grupo p 16+ e de 34% no grupo p16 negativo. A sobrevida global foi de 62% no grupo p16 + e de 26% no grupo HPV (-).

Posner et al. analisaram 111 pacientes com câncer de orofaringe. Foi realizado pesquisa do DNA do vírus por PCR, 56(50%) eram HPV e 55 (50%) eram HPV (-). Em cinco anos, 82% dos pacientes estavam vivos HPV (+) em comparação com 35% dos pacientes HPV (-)⁴¹.

Fakhryet al. estudaram 96 pacientes estágio III ou IV de cânceres de orofaringe e de laringe, A presença do DNA do HPV foi identificado através da PCR e da hibridização "in situ" tendo sido positiva em 38 pacientes (40%). A sobrevida livre de doença foi de 91% no primeiro ano e de 86% no segundo ano nos pacientes HPV (+). Nos HPV negativos no primeiro ano foi de 69% e no segundo ano de 53%. Em comparação com pacientes com tumores HPV-negativos, os pacientes com tumores HPV-positivos tiveram maiores taxas de resposta após a quimioterapia de indução (82% vs 55%) e após o tratamento radioquimioterapia (84% vs 57%). A sobrevivência global de 2 anos = 95% vs 62%.⁴³.

1.11 Vacina contra o HPV

Até o momento estão disponíveis duas vacinas contra o HPV, Gardasil®(Merck &Co., White house Station, NJ, EUA) que é uma vacina contendo VLP (Partícula semelhante a vírus) dos tipos 6, 11, 16 e 18 e a Cervarix® (GlaxoSmithKline Biologicals, Rixensart, Bélgica) uma vacina contendo VLP dos tipos 16 e 18.⁴²

Ambas as vacinas são eficazes em prevenir as infecções anogenitais e às neoplasias causadas pelos tipos incluídos nas vacinas⁴²; porém, até o momento não há trabalhos evidenciando uma diminuição da incidência dos tumores de cabeça e pescoço.⁴²

Em um estudo com 2627 participantes, homens e mulheres de 18 a 33 anos foram analisados para a presença ou ausência de HPV em enxágue bucal quatro anos após a vacinação. 18,3 % deles receberam uma ou mais doses da vacina. O estudo observou uma prevalência do HPV tipos 16,18,6 ou 11 em cavidade oral de 0,11 em vacinados versus 1,61 por cento nos não vacinados⁴⁵.

1.12 Tratamento do câncer de orofaringe

O tratamento para carcinomas de orofaringe associados ao HPV é o mesmo para os HPV negativos. Exceto em ensaios clínicos. Embora avaliar o estatus HPV do paciente seja de suma importância para estadiar e prever um prognóstico do mesmo, ainda não temos respaldo para fazer tratamentos diferentes.²⁶

Alguns trabalhos estudaram a desintensificação do tratamento da TR e / ou quimioterapia mostrando resultados encorajadores em estudos de fase II não randomizados⁴⁶⁻⁴⁹. Em virtude do bom prognóstico que esses pacientes apresentam após a terapia padrão, são necessários mais estudos para melhor avaliar a eficácia e segurança da desintensificação do tratamento como medida padrão.

1.13 Ancestralidade genômica

A população do Brasil é muito miscigenada. Formada principalmente pela mistura de europeus, africanos e nativos indígenas⁵⁰. Devido a esta grande miscigenação, a cor da pele e etnia autodeclarada muitas vezes é insuficiente para classificar ou caracterizar a etnia de um indivíduo e nem sempre correspondendo com a sua ancestralidade genômica⁵¹⁻⁵³. Além disso cada região do Brasil teve colonização diferente o que expressa diferenças na composição étnica destas populações⁵⁴. Estudos recentes tem demonstrado uma fraca correlação entre a cor da pele ou etnia auto declarada com a ancestralidade genética determinada por marcadores de DNA^{55, 56}.

Vários trabalhos vêm demonstrando o uso de marcadores informativos da ancestralidade (AIMs). Esses marcadores de ancestralidade são constituídos por polimorfismos de inserção e deleção (INDELS) onde mostram diferenciais de frequência de alelos marcados entre populações ancestrais ou geograficamente distantes e são especialmente úteis para inferir a provável origem ancestral de um indivíduo ou estimando a repartição de componentes de ancestralidade em indivíduos ou populações. Nestes testes consegue-se estimar as porcentagens de genes europeus, africanos e ameríndios (indígenas) de um indivíduo.⁵⁷

Pereira et. al., (2012)⁵⁷ selecionou um conjunto de 46 AIM para medir proporções de mistura populacional de quatro origens diferentes (Africano, europeu, asiático oriental e

americano nativo). Um total de 1002 amostras de DNA foram usadas neste estudo representando um total de 584 indivíduos de 40 populações diferentes foram analisadas quanto a esses 46 AIM. Assim eles organizaram os padrões mais frequentes de alterações genéticas presentes nos (Africano, europeu, asiático oriental e americano nativo). Esta é a técnica que utilizamos no nosso estudo.

2. JUSTIFICATIVA

O perfil epidemiológico dos pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe vem mudando ao longo das últimas década. Essa mudança ocorreu principalmente em decorrência da mudança dos fatores etiológicos: antes o tabagismo e etilismo e hoje o HPV como causa principal desses tumores.

Tumores de orofaringe relacionados ao HPV têm um comportamento biológico diferente dos não relacionados ao HPV. Assim o conhecimento da relação das diferentes variáveis epidemiológicas e clínicas com a positividade ao HPV nesses tumores é de suma importância para sua melhor compreensão.

Outro ponto relevante é que a prevalência do HPV varia de acordo com a época do estudo e da população estudada. Países desenvolvidos apresentam uma maior prevalência do que países em desenvolvimento. O Brasil quando é referido em estudos sobre a relação do HPV com os tumores de orofaringe sempre é classificado como um país em desenvolvimento e conseqüentemente com baixa prevalência de HPV. Como o Brasil é um dos maiores países em extensão no mundo, com regiões com diferentes IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) poderia apresentar regiões com diferentes prevalências de HPV.

Este trabalho compara o status HPV em pacientes com carcinoma de orofaringe em regiões com diferentes **Índices de desenvolvimento humano (IDH)** em um mesmo país em um mesmo intervalo de tempo, assim é um dos trabalhos pioneiros envolvendo a temática no Brasil. O Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) é uma medida desenvolvida pela Organização das Nações Unidas (ONU) para medir o bem estar de uma população ⁵¹. O Índice considera três dimensões: a longevidade, a renda e a educação da população. ⁵¹ O IDH varia de 0 a 1, e quanto maior melhores as condições de vida da população estudada.

No Brasil em 2010 os estados brasileiros foram classificados pela OMS de acordo com o IDH (Anexo A).

Outro ponto pertinente do presente trabalho é a importância de analisar o **comportamento sexual** e os **hábitos como tabagismo e etilismo** dos pacientes com câncer de orofaringe além de outras variáveis e correlacionar com a positividade ao HPV.

Além do exposto anteriormente, o **perfil de ancestralidade genômica** dos pacientes poderia estar relacionado a diferentes susceptibilidades a infecções, incluindo o status de infecção ao HPV, o que torna imperativo a correlação do carcinoma de orofaringe com os diferentes perfis genômico, clínico e epidemiológico. Dessa forma, esse estudo se propõe a contribuir com a literatura e o manejo clínico desses pacientes.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar o perfil epidemiológico nos carcinomas espinocelulares de orofaringe, analisando a presença do HPV, encontradas em regiões distintas do Brasil.

3.2 Objetivos específicos

- Descrever as características clínicas e demográficas dos pacientes comparando por positividade ao HPV.
- Identificar a prevalência do HPV nos tumores de orofaringe dos pacientes estudados.
- Correlacionar o IDH da região de moradia dos pacientes com a positividade ao HPV nos pacientes estudados.
- Determinar o perfil de ancestralidade genética dos pacientes incluídos no estudo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Instituições participantes

Hospital de Amor Barretos (HAB)

O Hospital de Amor Barretos fica localizado na cidade de Barretos interior de São Paulo, sendo fundado em 1967. É uma instituição especializada em atendimento a pacientes oncológicos. Está voltada tanto à parte assistencial como de ensino e pesquisa. Atende pacientes de todo o Brasil, principalmente os pacientes das regiões Centro-Oeste e Sudeste. Realiza em média 4.100 atendimentos por dia.

Hospital de Amor Amazônia (HAA)

O hospital de Amor Amazônia fica localizado na cidade de Porto Velho capital do Estado de Rondônia, Norte do Brasil. O Hospital surgiu em 2012 inicialmente como uma unidade de atendimento do Hospital de Barretos. A unidade cresceu e deu origem ao atual Hospital de Amor Amazônia, inaugurado em 23 de Novembro de 2017. Segue os mesmos protocolos clínicos do Hospital de Câncer de Barretos assim como a estrutura física segue os mesmos moldes. É também uma instituição especializada em atendimento a pacientes oncológicos.

4.2 Desenho do estudo

Realizamos um estudo transversal que fez parte da linha de pesquisa “Oncologia molecular” do programa de Pós-graduação em oncologia do Hospital de Câncer de Barretos.

4.3 População do estudo

Todos os pacientes com diagnóstico de câncer de orofaringe atendidos no Hospital de Amor Barretos no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2017 e no Hospital de Amor Amazônia de janeiro de 2014 a dezembro de 2019 que preencheram os critérios de inclusão e exclusão.

Foram incluídos tanto os vivos como os casos que já foram a óbito. Foi autorizado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) nos casos de pacientes que já tinham evoluído para óbito.

Critérios de inclusão

Pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular de orofaringe atendidos no Hospital de Amor Barretos no período de Janeiro de 2014 a dezembro de 2017 e no Hospital de Amor Amazônia de Janeiro de 2014 a Dezembro de 2019.

Critérios de exclusão

Pacientes cujos blocos de parafina não foram encontrados ou não terem material suficiente para pesquisa do p16.

Menores de 18 anos

4.4 Etapas da pesquisa

4.4.1 Coleta de dados clínicos epidemiológicos

Dados demográficos (sexo, idade, estado civil) e clínico-patológicos (TNM, estágio clínico de acordo com a oitava edição da American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system) foram obtidos dos prontuários e colocados em um formulário confeccionado na plataforma Research Electronic Data Capture (REDCap) (ANEXO B)

4.4.2 Formulário sobre hábitos e comportamento sexual

Durante as consultas, os pacientes foram convidados a responder um formulário sobre hábitos como tabagismo, etilismo e o comportamento sexual (ANEXO C).

À medida que os pacientes eram atendidos no ambulatório da especialidade, estes foram convidados a participar da pesquisa. Foi explicado todo o procedimento da pesquisa e entregue o TCLE. Neste momento os pacientes eram convidados a responder as perguntas do formulário.

As questões contidas no formulário foram perguntadas diretamente ao entrevistado e anotadas por um entrevistador.

Foram adotados os seguintes cuidados durante a aplicação do formulário.

A- O formulário foi aplicado em um consultório por um médico(a) ou enfermeiro(a) treinado(a).

B- Foi solicitado aos acompanhantes se ausentarem neste momento para manter o sigilo e a privacidade.

B- Em caso de paciente do sexo feminino o formulário foi aplicado por um profissional do sexo feminino para evitar qualquer constrangimento quanto as questões que envolvem sexualidade.

Dos 252 pacientes do estudo, 125 responderam a um questionário sobre comportamento sexual e hábitos de tabagismo e etilismo.

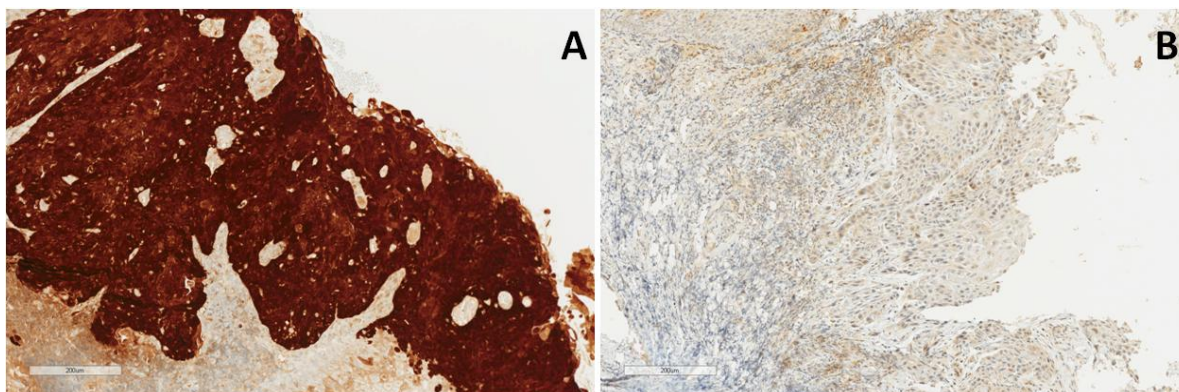
4.4.3 Identificação do status HPV

O status HPV foi determinado em todos os pacientes através da pesquisa da proteína p16 por imunohistoquímica, que é um marcador substituto bem estabelecido para caracterizar os tumores de orofaringe HPV (+)⁵⁸.

Os blocos de parafina referentes a biópsia ou cirurgia dos pacientes foram separados, as áreas mais representativas dos blocos de parafina contendo os tumores foram selecionadas para a preparação de cortes de 4µm, para a confecção de nova lâmina. Essa nova lâmina foi realizada imunohistoquímica utilizando o kit CINtec® p16 Histology (Roche MTM Laboratories, Heidelberg, Alemanha) de acordo com as instruções do fabricante. A expressão de p16 foi classificada como positiva na presença de coloração forte e difusa, tanto nuclear quanto citoplasmática acima de 75%. Qualquer outro padrão de coloração foi classificado como negativo(Figura 8).^{59, 60,61}

Assim consideramos HPV (+) os pacientes com positividade ao p16 por imunohistoquímica que é um método prático, de baixo custo e com forte correlação com a positividade ao HPV^{18 e 19}.

Figura 8 - Fotomicrografia representativa de expressão de p16 (imunohistoquímica).



Aumento de 10x. A: CEC de orofaringe com imunohistoquímica positiva ao p16. B: CEC de orofaringe com imunohistoquímica negativa ao p16.

4.4.4 Análise de Ancestralidade

A análise da ancestralidade genética foi realizada em 40 pacientes do estudo. A amostra foi de conveniência.

A metodologia utilizada foi a seguinte:

Extração do DNA tumoral

O DNA tumoral foi extraído através de amostras cirúrgicas ou biópsia de orofaringe de tecidos parafinizados. Os blocos de parafina dos pacientes selecionados foram submetidos a 4-5 cortes de 10µm para realização da extração de DNA. Nos preocupamos em fazer com que o processamento não acabasse com o bloco de parafina que continha o material tumoral do paciente⁵⁷. Utilizamos o kit de extração de DNA (QiagenDNAMicrokit) segundo especificações dos fabricantes.

Determinação dos marcadores de ancestralidade genética

Após a obtenção do DNA das amostras selecionadas, a ancestralidade dos indivíduos incluídos no estudo foi determinada utilizando-se um painel de 46 marcadores informativos da ancestralidade (AIMs), constituídos por polimorfismos de inserção e deleção (INDELs) como descrito por Pereira et. al.⁵⁷.

Após extração do DNA, foi realizado um PCR multiplex, com 46 primers e os produtos amplificados foram analisados em um ABI 3500 Genetic Analyzer xL (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. As condições de PCR e a sequências dos primers foram realizadas de acordo com Pereira et al.⁵⁷. A proporção da ancestralidade foi obtida a partir da análise com os softwares GeneMapper v.4.1 (Life Technologies) e Structure v.2.3.4⁵⁷. Consideramos os quatro principais grupos de nativos que compõem a população brasileira (Africano, Europeu, Asiático oriental e Americano nativo).

Utilizamos a mediana como referência para a porcentagem de componente ancestral em cada população em relação aos cálculos estatísticos e não a média. Porque a média tem muita variabilidade podendo ficar concentrados em uma ou outra extremidade. A mediana é uma medida de tendência central que melhor se adéqua para este propósito.

4.5 Análise estatística

Utilizamos o software SPSS versão 21 (SPSS, Inc, Chicago, Illinois) para as análises estatísticas. As características sócio demográficas e clínicas baseadas no status HPV foram analisadas utilizando o teste de Qui-quadrado (ou exato de Fisher), quando as variáveis eram qualitativas, e de Mann-Whitney para variáveis quantitativas. Foi considerado estatisticamente significativo o p-valor < 0,05. Para verificar a relação em conjunto das variáveis estudadas com a positividade ao HPV utilizamos a regressão logística multivariada, através do qual estimamos a Odds Ratio (OR) e seu respectivo intervalo de confiança.

Para verificar a relação em conjunto das variáveis estudadas com a positividade ao p16 utilizamos a regressão logística multivariada, através do qual estimamos a Odds Ratio (OR) e seu respectivo 95%.

Para verificar a possível relação de cada uma das ancestralidades genéticas com determinadas características utilizamos o teste de Kruskal-wallis e Man-whitney.

Em todo estudo, foi considerado a significância de 0,05 e os dados foram analisados pelo software SPSS v21.

4.6 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos. Parecer número 1.943.689 (ANEXO D)

Foi fornecido o termo de consentimento livre e esclarecido para os participantes da pesquisa. (ANEXO E). Não participaram grupos vulneráveis ou legalmente incapazes, assim mantendo o princípio da autonomia.

Houve a dispensa do termo de consentimento livre esclarecidos para uso do bloco de parafina para pesquisa da proteína p16 por imunohistoquímica e da ancestralidade para aqueles pacientes que já foram a óbito.

Os pesquisadores se comprometeram a não esgotar o material proveniente de parafina para a pesquisa, ficando material suficiente disponível para testes futuros com finalidade de diagnóstico.

Foi assegurado ainda que a identidade dos pacientes não será revelada em nenhum momento da pesquisa.

5. RESULTADOS

No período de janeiro de 2014 a dezembro de 2019 incluímos um total de 252 pacientes com diagnóstico de CEC de orofaringe atendidos no Hospital de Amor Barretos ou no Hospital de Amor Amazônia. Entraram no estudo pacientes atendidos nestes períodos que preencheram os critérios de inclusão e exclusão. Realizamos a pesquisa da expressão de p16 por imunohistoquímica em todos os 252 pacientes.

Dos 252 pacientes do estudo, 125 responderam ao questionário sobre comportamento sexual e hábitos de tabagismo e etilismo.

Além disso, para um subgrupo composto por 40 pacientes, realizamos a extração do DNA e avaliamos uma série de marcadores para caracterização das proporções de ancestralidade para os grupos étnicos (Europeu, Africano, Asiático e ameríndio).

No anexo F incluímos a aprovação do manuscrito enviado para publicação na revista Plos one.

5.1 Dados epidemiológicos e características clínico-patológicas

A maioria dos pacientes, 221 (87,7%) era do gênero masculino. A idade variou de 26 a 98 anos, com média de 60,5 anos. A faixa etária mais frequente foi de 50-59 anos com 85(33,73%) pacientes. Em relação à escolaridade, 30 (12,93%) dos pacientes eram analfabetos ou sabiam apenas ler e escrever, 134 (57,75%) tinham o primeiro grau, 41 (17,67%) tinham o segundo grau e 27 (11,63%) tinham nível superior. E em relação a cor da pele 142 (58,43 %) dos pacientes eram auto-declarados de cor branca enquanto 101 (41,56%) se auto-declararam como não brancos (pardos, negros, asiáticos, indígenas).

Em relação ao estado civil, 18,79% (133/233) dos pacientes tinham companheiro fixo (casado ou união estável), 21,46% (50/233) não tinham companheiro fixo (viúvo ou separado) e 21,46% (50/233) eram solteiros.

A prevalência de HPV nos carcinomas de orofaringe neste estudo foi de 32,14%.

Quando comparamos o grupo HPV (+) em relação ao grupo HPV (-), o grupo HPV (-) apresentou uma maior predominância do sexo masculino (92,4% vs 77,8%, P=0,01). No grupo HPV (+) os pacientes eram mais jovens, com faixa etária predominante de 50-59 anos

vs 60-69 anos ($P=0,005$). Não encontramos diferenças estatisticamente significativas em relação a etnia. O grupo HPV (+) apresentava uma maior quantidade de pacientes com nível superior (24,7% vs 4,6%, $P<0,001$) e pacientes com segundo grau (23,5% vs 14,6%, $P<0,001$). No grupo p16 (-) apresentava uma maior quantidade de indivíduos analfabetos ou que sabiam apenas ler e escrever (15,2% vs 8,6%, $P<0,001$) (Tabela 7).

Não encontramos diferenças estatisticamente significativas em relação ao T, N ou M. Porém no grupo HPV (+) encontramos uma maior quantidade de pacientes com estágio clínico inicial I e II (52,6% vs 13,1%, $P<0,001$) (Tabela 7).

Tabela 7– Caracterização da positividade do HPV em relação às características epidemiológicas dos pacientes

Variáveis	HPV				P-valor
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Gênero^a					
Masculino	158	(92,4)	63	(77,8)	0,010*
Feminino	13	(7,6)	18	(22,2)	
Idade^b					
20-29	1	(6,1)	0	(0,0)	0,005*
30-39	1	(6,1)	3	(3,7)	
40-49	27	(15,8)	25	(30,9)	
50-59	54	(31,6)	31	(38,3)	
60-69	57	(33,3)	15	(18,5)	
70-79	22	(12,9)	6	(7,4)	
80-89	8	(4,7)	1	(1,2)	
90-99	1	(0,6)	0	(0,0)	
Etnia^a					
Branco	92	(55,4)	50	(64,9)	0.160
Não branco	74	(44,6)	27	(35,1)	
Escolaridade^a					
Analfabeto/sabe ler e escrever	23	(15,2)	7	(8,6)	0,001*
Primeiro grau	99	(65,6)	35	(43,2)	
Segundo Grau	22	(14,6)	19	(23,5)	
Superior	7	(4,6)	20	(24,7)	
T^a					
T1/T2	53	(31,5)	33	(42,3)	0,100
T3/T4	115	(68,5)	45	(57,7)	
N^a					

N0	41	(24,4)	17	(21,8)	0,654
N positivo	127	(75,6)	61	(78,2)	
M^b					
M0	161	(95,8)	72	(92,3)	0,357
M1	7	(4,2)	6	(7,7)	
Estadiamento TNM^a					
Inicial I e II	22	(13,1)	41	(52,6)	0,001*
Avançado III e IV	146	(86,9)	37	(47,4)	

^a Análise pelo teste Qui-quadrado expressa como frequência absoluta (n) e relativa (%)

^b Análise pelo teste exato de Fisher expressa como frequência absoluta (n) e relativa (%)

* Diferença estatisticamente significativa P <ou = 0,05

Classificamos os pacientes de acordo com o IDH do estado de moradia dividindo em pacientes com IDH baixo <0,7 e IDH alto > ou = a 0,7 conforme classificação em Anexo A. Não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de IDH alto ou baixo em relação a positividade ao HPV (Tabela 8).

Tabela 8– Comparação do IDH com a positividade ao HPV

Variáveis	IDH				P-valor
	Baixo		Alto		
	n	(%)	n	(%)	
HPV^a					
Negativo	48	(63,2)	123	(69,9)	0,294
Positivo	28	(36,8)	53	(30,1)	

^a Análise pelo teste Qui-quadrado expressa como frequência absoluta (n) e relativa (%)

^b Análise pelo teste exato de Fisher expressa como frequência absoluta (n) e relativa (%)

* Diferença estatisticamente significativa P <ou = 0,05

5.2 Dados sobre o comportamento sexual e hábitos de tabagismo e etilismo

Em relação aos dados dos formulários, encontramos uma maior prevalência de pacientes que nunca beberam no grupo HPV (+) em relação aos HPV (-) (16% vs 2,7%, P=0,015),

encontramos também uma maior predominância de pacientes que nunca fumaram no grupo HPV (+) em relação aos HPV (-) (32% vs 6,7%, $P < 0,001$) (Tabela 9).

Não encontramos diferenças estatisticamente significativas em relação ao número de parceiros sexuais ao longo da vida e também não encontramos diferenças estatisticamente significativas em relação ao número de parceiros com que os pacientes praticaram sexo oral seja passivo ou ativo (Tabela 9).

Tabela 9– Dados do questionário relativos ao hábito de fumar, etilismo e comportamento sexual

Variáveis	HPV				P-valor
	Negativo		Positivo		
	n	(%)	n	(%)	
Alcool^b					
Nunca bebeu	2	(2,7)	8	(16,0)	0,015*
Ex etilista	46	(61,3)	22	(44,0)	
Etilista atual	27	(36,0)	20	(40,0)	
Tabagismo^a					
Nunca fumou	5	(6,7)	16	(32,0)	0,001*
Ex tabagista	34	(45,3)	18	(36,0)	
Tabagista atual	36	(48,0)	16	(32,0)	
Número de parceiros sexuais ao longo da vida^a					
Nenhum	0	(0,0)	0	(0,0)	0,362
1 a 3	12	(16,0)	10	(20,0)	
4 a 10	27	(36,0)	12	(24,0)	
>10	36	(48,0)	28	(56,0)	
Número de parceiros em que o paciente praticou sexo oral ativo ao longo da vida^b					
Nenhum	37	(50,7)	15	(30,0)	0,126

1 a 3	27	(37,0)	24	(48,0)	
4 a 10	4	(5,5)	5	(10,0)	
>10	5	(6,8)	6	(12,0)	
Número de parceiros em que o paciente praticou sexo oral passivo ao longo da vida^a					
Nenhum	29	(39,2)	9	(18,0)	
1 a 3	29	(39,2)	22	(44,0)	0,559
4 a 10	8	(10,8)	11	(22,0)	
>10	8	(10,8)	8	(16,0)	

^a Análise pelo teste Qui-quadrado expressa como frequência absoluta (n) e relativa (%)

^b Análise pelo teste exato de Fisher expressa como frequência absoluta (n) e relativa (%)

* Diferença estatisticamente significativa $P < 0,05$

5.3 Regressão logística uni e multivariada

Quando usamos a regressão logística uni e multivariada observamos que o sexo feminino (OR, 3,47; 95% CI, 1,60-7,51) e o nível de escolaridade superior (OR, 9,39; 95% CI, 2,81-31,38) estão significativamente relacionados a uma maior chance de o indivíduo ser HPV (+). Enquanto etilista atual (OR, 0,14; 95% CI, 0,04-0,44), tabagista atual (OR, 0,14; 95% CI, 0,04-0,44), e EC avançado (OR, 0,14; 95% CI, 0,07-0,26) estão significativamente relacionadas a uma menor chance de serem HPV (+) (Tabela 10).

Tabela 10– Modelo da Análise uni e multivariada de dados sócio demográficos e HPV

Variáveis	Univariado				Multivariado			
	Odds ratio	Intervalo de Confiança para Odds ratio		p-valor	Odds ratio	Intervalo de Confiança para Odds ratio		P-valor
		Inferior	Superior			Inferior	Superior	
Sexo								
Masculino	1	-	-		1	-	-	
Feminino	3,473	1,606	7,506	0,002	3,872	0,808	18,558	0,09
Alcool								
Nunca bebeu	1	-	-	0,032	1	-	-	0,227
Ex etilista	0,120	0,023	0,611	0,011	0,297	0,037	2,356	0,25
Etilista atual	0,186	0,186	0,035	0,046	0,593	0,065	5,372	0,642
Tabagismo								
Nunca fumou	1	-	-	0,003	1	-	-	0,246
Ex tabagista	0,165	0,052	0,525	0,002	0,283	0,064	1,242	0,094
Tabagista atual	0,139	0,043	0,445	0,001	0,354	0,077	1,62	0,181
Escolaridade								
Analfabeto ou sabe ler/escrever	1	-	-	<0,001	1	-	-	0,295
primeiro grau	1,182	0,458	2,943	0,752	1,537	0,451	5,234	0,492
segundo grau	2,838	0,998	8,071	0,051	2,984	0,652	13,665	0,159
superior	9,388	2,808	31,385	<0,001	4,300	0,716	25,837	0,111
EC								
Inicial	1	-	-	-	1	-	-	
Avançado	0.136	0.072	0.256	<0,001	0.182	0.067	0.492	0.001*

* Diferença estatisticamente significativa P <ou = 0,05

5.4 Ancestralidade genômica

O DNA tumoral foi extraído de 40/252 pacientes, sendo determinado a estimativa da ancestralidade através painel de 46 marcadores de ancestralidade (AIM-INDELS) como descrito por Pereira et. al⁵⁷. Observamos uma enorme miscigenação na composição genética da população estudada.

Obtivemos as seguintes médias de proporções de ancestralidade: africana 0,18, europeia 0,63, asiática 0,08 e ameríndia 0,09 (Tabela 11)

Tabela 11 - Composição da Ancestralidade nos pacientes estudados

	N	Média	Mediana
Africana	40	0,18(0,16)	0,13(0,02-0,66)
Europeia	40	0,63(0,21)	0,66(0,14-0,94)
Asiática	40	0,08(0,07)	0,07(0,02-0,31)
Ameríndia	40	0,09(0,10)	0,06(0,00-0,46)

Analizamos a composição dos marcadores de ancestralidade nos grupos HPV (+) e HPV (-) e observamos uma predominância de proporção de ancestralidade europeia em ambos os grupos (Tabela 12, Figura 9)

Na Figura 9 também observamos a comparação gráfica não houve diferença entre os padrões de ancestralidade entre o grupo HPV (+) e o grupo HPV (-).

Tabela 12 - Distribuição das Frequências das Ancestralidades de acordo com a positividade ao p16

P16	Africana	Europeia	Asiática	Ameríndia
Negativo (N=171)	0,19	0,61	0,09	0,10
Positivo (N=81)	0,17	0,67	0,08	0,09

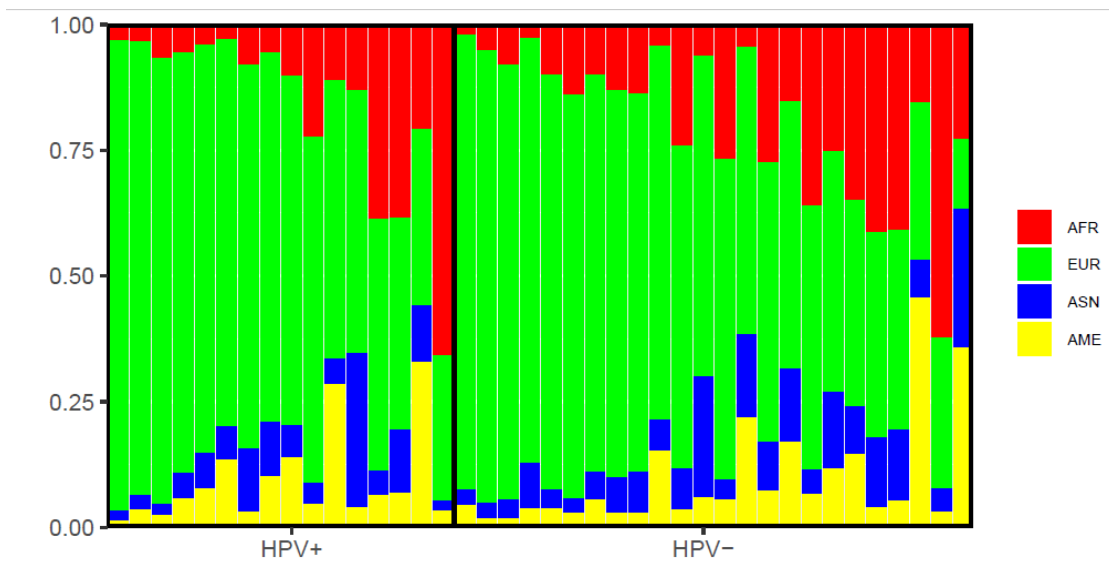


Figura 9 - Representação gráfica da estimativa da ancestralidade nos grupos HPV (+) e HPV (-) a partir dos dados de genotipagem do painel de 46 marcadores. Cada barra vertical representa um indivíduo. A proporção de ancestralidade (porcentagem) está representada em cores: Vermelha – Africana; Verde - Europeia ; Azul – Asiática; Amarela – Ameríndia.

Com o objetivo de avaliar o papel de cada etnia distinta no perfil epidemiopatológico, analisamos de forma independente os marcadores de 4 etnias com a positividade ao HPV (Tabelas 13 a 15). Não encontramos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos HPV (+) e (-).

Tabela 13- Associação entre ancestralidade africana e HPV

		Ancestralidade Africana			
		N	Média	Mediana	P-valor
HPV ^a	Negativo	24	0,19(0,15)	0,14(0,02-0,62)	0,448
	Positivo	16	0,17(0,17)	0,10(0,03-0,66)	

(a) Teste de Mann-Whitney

* Diferença estatisticamente significativa P < ou = 0,05

Tabela 14- Associação entre ancestralidade Europeia e HPV

		Ancestralidade Européia			
		N	Média	Mediana	P-valor
HPV ^a	Negativo	24	0,61(0,21)	0,64(0,14-0,90)	0,499
	Positivo	16	0,67(0,20)	0,71(0,29-0,94)	

(a) Teste de Mann-Whitney

* Diferença estatisticamente significativa P < ou = 0,05

Tabela 15- Associação entre ancestralidade Asiática e HPV

		Ancestralidade Asiática			
		N	Média	Mediana	P-valor
HPV	Negativo	24	0,09(0,06)	0,08(0,03-0,27)	0,275
	Positivo	16	0,08(0,07)	0,06(0,02-0,31)	

(a) Teste de Mann-Whitney

* Diferença estatisticamente significativa P < ou = 0,05

Tabela 16- Associação entre ancestralidade Ameríndia e HPV

		Ancestralidade Ameríndia			
		N	Média	Mediana	P-valor
HPV ^a	Negativo	24	0,10(0,06)	0,06(0,02-0,46)	0,836
	Positivo	16	0,09(0,09)	0,05(0,00-0,33)	

(a) Teste de Mann-Whitney

* Diferença estatisticamente significativa P < ou = 0,05

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, evidenciamos que o carcinoma espinocelular de orofaringe HPV (+) foi mais comum em pacientes que nunca beberam, em pacientes que nunca fumaram, naqueles com maior nível educacional e foi associada a tumores que se apresentaram em estágio clínico inicial (I e II).

Os estudos relacionando o HPV com o carcinoma espinocelular de orofaringe em sua maioria não tem uma padronização quanto a metodologia; assim, vários autores utilizaram diferentes métodos diagnósticos para o HPV (p16, PCR etc.) e conseqüentemente encontraram diferentes taxas de prevalência. Além disso, a prevalência depende da população estudada e da época que o estudo foi realizado. Cabe destacar que neste estudo todos os pacientes tinham o resultado do exame imunohistoquímico de p16 caracterizando o caso com HPV positivo ou negativo.

Nosso estudo evidenciou uma prevalência de positividade ao HPV nos carcinomas de orofaringe de 32,14%. A maioria dos trabalhos envolvendo populações de países em desenvolvimento apresentam baixas incidências de HPV nos tumores de orofaringe^{62, 63}. López e colaboradores no Brasil encontraram uma incidência de 6,6%³³. Anantharaman³⁴ em 2017 comparou casos dos EUA, Europa e Brasil encontrando em 171 casos no Brasil uma incidência de apenas 4,1%. Petito³⁵ em 2017 estudando 82 casos no Brasil encontrou uma incidência de 25,6 %. Betiol encontrou 17,7%⁶⁴ e Cicco 59,1%⁶⁵. Outro estudo mais recente em país em desenvolvimento foi o de Bahl³⁸ que encontrou na Índia uma incidência de 22,8% de HPV nos tumores de orofaringe.

Nos países desenvolvidos há uma tendência de terem uma maior positividade ao HPV. Anantharaman³⁴ em seu estudo comparando EUA, Europa e Brasil encontrou uma incidência de HPV em 31,1% nos pacientes europeus com câncer de orofaringe. Nasman³⁹ estudando 98 pacientes com câncer de orofaringe na Suécia encontrou uma incidência de HPV de 79%.

A maioria dos pacientes de nosso estudo eram de estágio clínico avançado III ou IV tanto no grupo com o resultado do HPV (+) como HPV (-). Porém, especificamente no grupo HPV (+) encontramos proporcionalmente maior quantidade de pacientes com estágio clínico inicial I e II em relação ao grupo HPV(-) (52,6% vs 13,1%, P<0,001). De Cicco et al⁶⁵. encontrou resultados similares.

Com base no comportamento biológico do câncer de orofaringe induzido pelo HPV, houve uma mudança no estadiamento na oitava edição, gerando um estadiamento próprio para os tumores HPV positivos. Isso possibilitou a classificação desses pacientes em um estadiamento menor em comparação com os HPV negativos. Portanto, o que se observa nos nossos resultados são tumores que passaram a ser considerados iniciais devido ao novo estadiamento. Assim o novo estadiamento reflete melhor a HPV positiva e seu conseqüente melhor prognóstico.

Esta diferença entre os prognósticos em relação a positividade resultado do HPV foi contemplado na mudança do estadiamento que houve entre a 7ª e a 8ª edição do TNM. Na sétima edição eram considerados tumores iniciais apenas os T1 ou T2 N0, M0 independente do seu status HPV. Já na oitava edição os tumores HPV negativos continuaram sendo considerados iniciais os T1 ou T2 N0,M0, mas nos HPV positivos foram considerados como iniciais também os T3 e os N2. Essa mudança explica o motivo que obtivemos uma maior porcentagem de tumores iniciais nos casos com resultado de exame imunohistoquímico positivo ao p16. Embora houve separação do estadiamento dos carcinomas espinocelulares de orofaringe de acordo com a positividade ao HPV na 8ª edição do TNM, o tratamento para carcinomas de orofaringe associado ao HPV ainda é o mesmo para os HPV negativos, exceto em ensaios clínicos²⁶.

Ao fazermos a análise tanto uni como multivariada em nosso estudo os pacientes que apresentavam estadiamento clínico avançado (III e IV) tinham uma menor chance de serem HPV (+). O estudo de Mehanna²⁷ não encontrou os mesmo resultados, onde demonstrou que os pacientes estadio clínico IV apresentam uma maior chance de serem HPV (+) em relação ao estadio II (OR = 15,1; 95% CI= 2.1–110.4; p = 0,0115)

Por outro lado não foi observado em nosso estudo diferença estatisticamente significativa especificamente entre o tamanho do tumor, presença de metástases cervical ou metástase à distância e a positividade ao p16. Nossos achados foram semelhantes aos encontrados por López, 2014³³. Embora a maioria dos trabalhos correlaciona casos HPV (+) com a presença de metástases cervicais desproporcionais ao tamanho do tumor.^{35, 65} No nosso estudo embora encontramos uma maior proporção de tumores iniciais no grupo HPV (+) em relação ao grupo HPV (-) (42,3% vs 31,5%) porém sem significância estatística.

Um dos diferenciais do nosso estudo é a aplicação do questionário sobre comportamento sexual, tabagismo e consumo de álcool.

Encontramos uma maior predominância de pacientes que nunca fumaram no grupo HPV (+) em relação aos HPV (-) (32% vs 6,7%, $P < 0,001$). López, 2014³³ encontrou uma proporção de 14,3 % de pacientes que nunca fumaram nos HPV (+) e de 3,4 % nos pacientes HPV (-). Também encontrou uma maior proporção de tabagistas atuais entre os HPV (-) (69,8% vs 57,1%). O estudo de Bahl, 2014³⁸ também encontrou uma maior proporção de pacientes que nunca fumaram no grupo HPV (+) (17% vs 11%) porém sem diferença estatisticamente significativa $p = 0,86$. Além destes outros estudos evidenciam esta diferença de prevalência de positividade do exame imunohistoquímico p16 em relação ao tabagismo^{62, 65}. Na prática clínica observamos que esta diferença é explicada pela própria etiologia dos casos HPV (-), em sua maioria são relacionados ao etilismo e tabagismo.

Embora nesse estudo analisamos apenas 125 dos 252 pacientes responderam ao questionário sobre hábitos de tabagismo, etilismo e comportamento sexual, as variáveis tabagismo e etilismo tiveram significância estatística em nosso estudo. Em nosso estudo foi observada uma maior prevalência de pacientes que nunca beberam no grupo HPV (+) em relação aos HPV (-) (16% vs 2,7%, $P = 0,015$), Cicco⁶⁵ e López, 2014³³ encontraram resultados semelhantes. Por outro lado Bahl, 2014³⁸ não conseguiu evidenciar relação com o consumo de álcool e a positividade ao HPV. $P = 0,18$.

Em relação ao sexo encontramos uma maior predominância do sexo masculino no grupo com exame imunohistoquímico HPV (-) (92,4% vs 77,8%, $P = 0,01$). Estes dados estão de acordo com os achados de López, 2014³³ Petito, 2016³⁵ estudo ICON-S,²⁸ e Bahl, 2014³⁸. De Cicco não encontrou diferenças significativas em relação ao sexo e a positividade ao HPV⁶⁵. Na maioria dos casos, os tumores da região da cabeça e pescoço têm uma maior predileção pelos indivíduos do sexo masculino, principalmente devido a maior exposição ao álcool e fumo em relação as mulheres. Nos tumores de orofaringe seguem o mesmo padrão com maior prevalência no sexo masculino independente do status HPV. Porém quando uma mulher tem um carcinoma espinocelular de orofaringe a sua probabilidade é maior de ser HPV (+).

A idade dos pacientes do estudo variou de 26 a 98 anos, com média de 60,5 anos. A faixa etária mais frequente foi de 50-59 anos com 85 (33,73%) pacientes. No grupo HPV (+) os pacientes eram mais jovens, com faixa etária predominante de 50-59 anos vs 60-69 anos ($P=0,005$). Os dados da nossa pesquisa estão de acordo com a literatura mundial em que os tumores HPV (+) acometem os pacientes mais jovens^{38 35}. Por outro lado De Cicco não encontrou diferenças significativas em relação a idade entre HPV (+) ou (-)⁶⁵.

Em relação ao nível de escolaridade, o grupo com HPV (+) apresentava uma maior quantidade de pacientes com nível superior (24,7% vs 4,6%, $P<0,001$) e pacientes com segundo grau (23,5% vs 14,6%, $P<0,001$). No grupo HPV (-) apresentava uma maior quantidade de indivíduos analfabetos ou que sabiam apenas ler e escrever (15,2% vs 8,6%, $P<0,001$). Nossos resultados estão concordantes com a literatura mundial onde correlaciona tumores de orofaringe HPV (+) com pacientes com maior nível de escolaridade^{18 66}.

Nas seguintes variáveis não tiveram significância estatística em nosso estudo: número de parceiros sexuais ao longo da vida e número de parceiros que os pacientes praticaram sexo oral seja passivo ou ativo. Esses achados não estão de acordo com a literatura vigente que associa o comportamento sexual com a positividade ao HPV^{22 31 10 67 24 30}. Possivelmente nossos pacientes tiveram mais dificuldade para responder as perguntas quanto ao comportamento sexual por vergonha ou timidez o que explicaria nossos resultados.

Um de nossos objetivos específicos foi determinar o perfil de ancestralidade genética dos pacientes incluídos no estudo.

A população brasileira apresenta uma grande heterogeneidade genética. Sendo fruto principalmente da miscigenação dos povos nativos das Américas (Ameríndios), os povos colonizadores (Europeus) e os escravos trazidos da África (Africanos).

No nosso trabalho, determinamos as porcentagens de ancestralidade Africana (AFR), Europeia (EUR), Ameríndia (AME) e Asiática (ASN) para os pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe, através do painel de marcadores AIMs (Ancestry-informative Markers).

Encontramos um predomínio do componente EUR (73,9%), seguido do AFR (12,6%) e um equilíbrio entre as proporções dos componentes ASN (6,8%) e AME (6,7%). Esse

predomínio do componente europeu na ancestralidade dos brasileiros foi evidenciado por vários estudos^{56, 68-70}

O estudo de Leite⁵⁶ com 172 pacientes evidenciou 69% de ancestralidade europeia, 21% de ancestralidade africana e 10% de ameríndia. Outro estudo⁷⁰ com 934 pacientes de várias regiões do Brasil identificou nos pacientes ancestralidade europeia entre 60,6% e 77,7%, africana entre 10,9% e 30,3% e ameríndia entre 7,4% e 19,4%. Ainda corroborando com esses achados, o estudo de estudo de Lins⁶⁸ com 189 mulheres no climatério evidenciou uma ancestralidade europeia entre 69,5% e 87,7%, africana entre 7% e 18,7% e ameríndia 5,2% e 11,8%.

Esses dados mostram a forte influência europeia na composição genética da população brasileira. A técnica utilizada em nosso estudo foi desenvolvida por Pereira, 2012⁵⁷ que padronizou uma técnica para quantificação da proporção de ancestralidade do indivíduo. baseada no uso de 46 marcadores de ancestralidade AIM. Utilizou 1002 amostras de dna referente a 584 pacientes. Foram utilizados pacientes da angola, portugal, taiwan e tribos brasileiras da amazônia.

Outro trabalho utilizando os mesmos 46 AIM foi o de fernandes, 2016⁷¹ que foi um trabalho feito na cidade de Barretos - SP com 341 pacientes com câncer de mama. Encontraram uma proporção de 70,6% de ancestralidade europeia, 14,5% africana, 8,0% ameríndia e 6,8% asiática. Outros trabalhos utilizando os mesmos 46 AIM demonstram essa maior influência europeia na composição brasileira, dentre eles se destaca o estudo de manta 2013⁵⁴ realizado em uma população de Manaus, onde encontrou a seguinte proporção: AFR - 16,3 EUR - 45,9 AME - 37,8.

Não evidenciamos relação entre a positividade ao HPV e a ancestralidade genética em nosso estudo. Não encontramos trabalhos fazendo essa comparação. Na literatura é descrito uma correlação da etnia branca com a positividade ao HPV como no estudo de Settle, 2009⁷² que encontrou uma maior prevalência de HPV (+) nos pacientes brancos. Possivelmente não encontramos correlação devido a grande miscigenação da população brasileira

Assim mais estudos devem ser realizados sobre a prevalência do HPV nos carcinomas de orofaringe principalmente em países em desenvolvimento para demonstrar a importância desse tema e tentar associado a clínica ajudar a um melhor conhecimento dessa patologia.

9 CONCLUSÕES

Em nosso estudo encontramos que etilista e tabagista atual tiveram uma menor chance de serem HPV (+). Sexo feminino e nível de escolaridade superior tiveram uma maior chance de serem HPV (+).

Encontramos uma prevalência de HPV de 32,14% nos tumores de orofaringe dos pacientes estudados.

Não encontramos diferenças estatisticamente significativas em relação ao IDH da região de moradia dos pacientes com a positividade ao HPV nos pacientes estudados.

Em nosso estudo não encontramos correlação entre o número de parceiros sexuais ao longo da vida ou número de parceiros com os quais o paciente praticou sexo oral (passivo ou ativo) ao longo da vida e a positividade ao HPV.

Encontramos um predomínio da ancestralidade europeia, seguida da africana e um equilíbrio entre as proporções dos componentes asiático e ameríndio tanto no grupo HPV (+) como (-).

Esses resultados são relevantes, pois demonstram que os tumores orofaríngeos p16-positivos apresentam um perfil epidemiológico diferente. Com base em seu comportamento biológico e apresentação clínica, o câncer de orofaringe relacionado ao HPV é uma patologia que requer estudos mais aprofundados e maior compreensão, a fim de otimizar e estratificar melhor o cuidado e tratamento de pacientes com câncer de orofaringe.

REFERÊNCIAS

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin.* 2019;69(1):7-34.
3. INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Jose Alencar Gomes da Silva Instituto Nacional do Câncer - Rio de Janeiro. [Internet]: INCA; 2019 [cited 16/02/2020].
4. SBCCP - Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. O que é cirurgia de cabeça e pescoço? Disponível em: <http://www.sbccp.org.br/?page_id=362>. [Internet] 2016 [cited 01/06/2016].
5. Wyss A, Hashibe M, Chuang SC, Lee YC, Zhang ZF, Yu GP, et al. Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Am J Epidemiol.* 2013;178(5):679-90.
6. Iglesias R JP, Pinto M, Costa e Silva VL, Godinho J. . Controle do tabagismo no Brasil. Departamento de Desenvolvimento Humano - Região da América Latina e do Caribe. Banco Mundial. . 2007.
7. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4294-301.
8. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B. WHO International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol.* 2009 Apr;10(4):321-2.
9. Munoz N, Castellsague X, de Gonzalez AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine.* 2006;24 Suppl 3:S3/1-10.
10. FERRAZ LCS, A. B. R.; DISCACCIATI, M. G. . Ciclo celular, HPV e evolução da neoplasia intraepitelial cervical: Seleção de marcadores biológicos. . *Journal Health Sci Inst.* 2012.;30, (2):107-11.
11. Gonzalez SL, Stremmlau M, He X, Basile JR, Munger K. Degradation of the retinoblastoma tumor suppressor by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein is important for

functional inactivation and is separable from proteasomal degradation of E7. *J Virol.* 2001;75(16):7583-91.

12. Gronhoj Larsen C, Gyldenlove M, Jensen DH, Therkildsen MH, Kiss K, Norrild B, et al. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer.* 2014;110(6):1587-94.

13. Robinson M, Schache A, Sloan P, Thavaraj S. HPV specific testing: a requirement for oropharyngeal squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Pathol.* 2012;6 Suppl 1(Suppl 1):S83-90.

14. Fakhry C, Lacchetti C, Rooper LM, Jordan RC, Rischin D, Sturgis EM, et al. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: ASCO Clinical Practice Guideline Endorsement of the College of American Pathologists Guideline. *J Clin Oncol.* 2018;36(31):3152-61.

15. Lydiatt WM RJ, Patel SG. Oropharynx (p16-) and Hypopharynx. In: *AJCC Cancer Staging Manual, 8th, Amin MB (Ed), : Springer, New York 2017. 123 p.*

16. O'Sullivan B LW, Haughey BH, . HPV-Mediated (p16+) Oropharyngeal Cancer. In: . In: MB A, editor. *AJCC Cancer Staging Manual, 8th, : Springer, New York 2017. p. 113.*

17. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer.* 2010;116(9):2166-73.

18. 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(7):693-703.

19. D'Souza G, Gross ND, Pai SI, Haddad R, Anderson KS, Rajan S, et al. Oral human papillomavirus (HPV) infection in HPV-positive patients with oropharyngeal cancer and their partners. *J Clin Oncol.* 2014;32(23):2408-15.

20. Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003;348(6):518-27.

21. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005;14(2):467-75.

22. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2007;90:1-636.
23. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. J Clin Oncol. 2009;27(12):1992-8.
24. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. N Engl J Med. 2007;356(19):1944-56.
25. El-Salem F, Mansour M, Gitman M, Miles BA, Posner MR, Bakst RL, et al. Real-time PCR HPV genotyping in fine needle aspirations of metastatic head and neck squamous cell carcinoma: Exposing the limitations of conventional p16 immunostaining. Oral Oncol. 2019;90:74-9.
26. Vokes EE, Agrawal N, Seiwert TY. HPV-Associated Head and Neck Cancer. J Natl Cancer Inst. 2015;107(12):dju344.
27. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer--systematic review and meta-analysis of trends by time and region. Head Neck. 2013;35(5):747-55.
28. O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. Lancet Oncol. 2016;17(4):440-51.
29. Auluck A, Hislop G, Bajdik C, Poh C, Zhang L, Rosin M. Trends in oropharyngeal and oral cavity cancer incidence of human papillomavirus (HPV)-related and HPV-unrelated sites in a multicultural population: the British Columbia experience. Cancer. 2010;116(11):2635-44.
30. 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(9):1263-9.

31. 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(2):489-502.
32. 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;31(36):4550-9.
33. Lopez RV, Levi JE, Eluf-Neto J, Koifman RJ, Koifman S, Curado MP, et al. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. *Cancer Causes Control*. 2014;25(4):461-71.
34. 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;140(9):1968-75.
35. 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.
36. Piña AR, Jimenez LS, Mariano FV, de Andrade BAB, Carlos R, Altemani A, et al. Human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas from Guatemala and Brazil. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2016;121(4):412-8.
37. Cantarutti ALL, Fernandes LP, Saldanha MVdLF, Marques AEM, Vianna LMdS, de Melo NS, et al. Evaluation of immunohistochemical expression of p16 and presence of human papillomavirus in oral and oropharyngeal carcinoma. *The Journal of craniofacial surgery*. 2014;25(1):210-4.
38. Bahl A, Kumar P, Dar L, Mohanti BK, Sharma A, Thakar A, et al. Prevalence and trends of human papillomavirus in oropharyngeal cancer in a predominantly north Indian population. *Head Neck*. 2014;36(4):505-10.
39. Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*. 2009;125(2):362-6.

40. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1772-83.
41. Posner MR, Lorch JH, Goloubeva O, Tan M, Schumaker LM, Sarlis NJ, et al. Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial. *Ann Oncol.* 2011;22(5):1071-7.
42. Schiller JT, Lowy DR. Understanding and learning from the success of prophylactic human papillomavirus vaccines. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(10):681-92.
43. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(4):261-9.
44. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010;363(1):24-35.
45. Gillison ML, Broutian T, Graubard B, Pickard R, Tong Z-Y, Xiao W, et al. Impact of prophylactic human papillomavirus (HPV) vaccination on oral HPV infections among young adults in the U.S. *Journal of Clinical Oncology.* 2017;35(15_suppl):6003-.
46. Chera BS, Amdur RJ, Green R, Shen C, Gupta G, Tan X, et al. Phase II Trial of De-Intensified Chemoradiotherapy for Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2019;37(29):2661-9.
47. Ma DJ, Price KA, Moore EJ, Patel SH, Hinni ML, Garcia JJ, et al. Phase II Evaluation of Aggressive Dose De-Escalation for Adjuvant Chemoradiotherapy in Human Papillomavirus-Associated Oropharynx Squamous Cell Carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2019;37(22):1909-18.
48. Contreras JA, Spencer C, DeWees T, Haughey B, Henke LE, Chin R-I, et al. Eliminating Postoperative Radiation to the Pathologically Node-Negative Neck: Long-Term Results of a Prospective Phase II Study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2019;37(28):2548-55.

49. Marur S, Li S, Cmelak AJ, Gillison ML, Zhao WJ, Ferris RL, et al. E1308: Phase II Trial of Induction Chemotherapy Followed by Reduced-Dose Radiation and Weekly Cetuximab in Patients With HPV-Associated Resectable Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx-ECOG-ACRIN Cancer Research Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2017;35(5):490-7.
50. Souza AMd, Resende SS, Sousa TNd, Brito CFAd. [PROVISIONAL] A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genetics and molecular biology*. 2019(AHEAD).
51. Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, Magalhaes WC, Horimoto AR, Horta BL, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(28):8696-701.
52. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, Gouveia M, Horta BL, Mambrini J, et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep*. 2015;5:9812.
53. Risch N, Choudhry S, Via M, Basu A, Sebro R, Eng C, et al. Ancestry-related assortative mating in Latino populations. *Genome Biol*. 2009;10(11):R132.
54. Manta FS, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmao L, Carvalho EF. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol*. 2013;40(1):94-8.
55. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Gentil P, Moreno-Lima R, Oliveira RJ, et al. Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *Journal of epidemiology*. 2011;21(4):240-5.
56. Leite TKM, Fonseca RMC, França NMd, Parra EJ, Pereira RW. Genomic Ancestry, Self-Reported "Color" and Quantitative Measures of Skin Pigmentation in Brazilian Admixed Siblings. *PLOS ONE*. 2011;6(11):e27162.
57. Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SE, Amorim A, et al. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One*. 2012;7(1):e29684.

58. Lewis JS, Jr., Beadle B, Bishop JA, Chernock RD, Colasacco C, Lacchetti C, et al. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(5):559-97.
59. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, He X, Pickard R, Koluder M, et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol*. 2012;36(7):945-54.
60. Grønhøj Larsen C, Gyldenløve M, Jensen DH, Therkildsen MH, Kiss K, Norrild B, et al. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer*. 2014;110(6):1587-94.
61. Possati-Resende JC, Fregnani JH, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The Accuracy of p16/Ki-67 and HPV Test in the Detection of CIN2/3 in Women Diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoS One*. 2015;10(7):e0134445.
62. Mehanna H, Franklin N, Compton N, Robinson M, Powell N, Biswas-Baldwin N, et al. Geographic variation in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer: Data from 4 multinational randomized trials. *Head Neck*. 2016;38 Suppl 1(Suppl 1):E1863-9.
63. Caley A, Evans M, Powell N, Paleri V, Tomkinson A, Urbano TG, et al. Multicentric human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2015;37(2):202-8.
64. Betiol JC, Sichero L, Costa HOO, 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;11:20.
65. De Cicco R, de Melo Menezes R. Impact of human papillomavirus status on survival and recurrence in a geographic region with a low prevalence of HPV-related cancer: A retrospective cohort study. 2020;42(1):93-102.
66. 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.
67. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-

- negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(6):407-20.
68. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council*. 2010;22(2):187-92.
69. Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Human heredity*. 2006;62(4):190-5.
70. Pena SDJ, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy FdSG, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PloS one*. 2011;6(2):e17063-e.
71. Fernandes GC, Michelli RAD, Galvão HCR, Paula AE, Pereira R, Andrade CE, et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget*. 2016;7(49):80465-81.
72. Settle K, Posner MR, Schumaker LM, Tan M, Suntharalingam M, Goloubeva O, et al. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009;2(9):776-81.
73. World Health Organization. Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD). Atlas do Desenvolvimento Humano no Brasil 2013. [Internet] 2013;Available from: <http://www.atlasbrasil.org.br/2013/>.

ANEXOS

ANEXO A – Índice de Desenvolvimento Humano nos estados Brasileiros em 2010

Posição	Estado	Região	IDH
1	Distrito Federal	Centro-oeste	0,824
2	São Paulo	Sudeste	0,783
3	Santa Catarina	Sul	0,774
4	Rio de Janeiro	Sudeste	0,761
5	Paraná	Sul	0,749
6	Rio Grande do Sul	Sul	0,746
7	Espírito Santo	Sudeste	0,740
8	Goiás	Centro-oeste	0,735
9	Minas Gerais	Sudeste	0,731
10	Mato Grosso do Sul	Centro-oeste	0,729
11	Mato Grosso	Centro-oeste	0,725
12	Amapá	Norte	0,708
13	Roraima	Norte	0,707
14	Tocantins	Norte	0,699
15	Rondônia	Norte	0,690
16	Rio Grande do Norte	Nordeste	0,684
17	Ceará	Nordeste	0,682
18	Amazonas	Norte	0,674
19	Pernambuco	Nordeste	0,673
20	Sergipe	Nordeste	0,665
21	Acre	Norte	0,663
22	Bahia	Nordeste	0,660
23	Paraíba	Nordeste	0,658

24	Piauí	Nordeste	0,646
25	Pará	Norte	0,646
26	Maranhão	Nordeste	0,639
27	Alagoas	Nordeste	0,631

Fonte: retirado do Atlas de desenvolvimento humano no Brasil ⁷³

ANEXO B - Ficha de coleta de dados

TUMORES DE CABEÇA E PESCOÇO E SUA RELAÇÃO COM O HPV ENTRE DOS ESTADOS CULTURALMENTE DIFERENTES			
Investigador Principal: Chrystiano de Campos Ferreira			
IDENTIFICAÇÃO			
1	ID NAP		1
2	Nome		2
3	Data de Nascimento	DD/MM/AAAA	3
4	RH	_____	4
5	Sexo	1- Masculino; 2- Feminino	5
6	Braço	1- Região Norte; 2-Região Sudeste	6
INFORMAÇÕES DO PACIENTE E DA DOENÇA			
8	Cidade de origem	Descrever; 99- Ignorado	8
9	Estado de origem	Sígl, Ex.: SP; 99- Ignorado	9
10	Cidade de residência	Descrever; 99- Ignorado	10
11	Estado de residência	Sígl, Ex.: SP; 99- Ignorado	11
12	Tempo que vive na residência atual	Em meses; 88-Não se aplica; 99-Ignorado	12
13	Raça:	1- Branco; 2- Pardo; 3- Negro; 4- Asiático; 5- Indígena; 99- Ignorado	13
14	Unidade de Tratamento	1- HCB; 2-Porto Velho	14
15	Nível de escolaridade	1- Analfabeto; 2- Sabe ler e escrever; 3- Primeiro grau incompleto; 4- Primeiro grau completo; 5- Segundo grau incompleto; 6- Segundo grau completo; 7- Superior incompleto; 8- Superior completo; 9- Pós-graduação; 99-Ignorado	15
16	Estado civil	0- Solteiro; 1- Casado / União estável; 2- Separado / Divorciado; 3- Viúvo	16
17	Data da Primeira Consulta	DD/MM/AAAA	17
18	Data do diagnóstico	DD/MM/AAAA	18
19	Data do início do Tratamento	DD/MM/AAAA	19
INFORMAÇÕES DA DOENÇA			
Histórico Oncológico/Informações da Doença			
26	Estágio inicial: T	0- N0; 1- T1; 2- T2; 3- T3; 4- T4a; 5- T4b; 99- Ignorado	26
27	Estágio inicial: N	1- N1; 2- N2a; 3- N2b; 4- N2c; 5- N3; 99- Ignorado	27
28	Estágio inicial: M	1- M0; 2- M1; 99- Ignorado	28
29	EC	1-I; 2-II; 3-III; 4-IV; 99-Ignorado	29
30	Subsítios acometidos	1- Pilares Amigdalianos; 2- Tonsilas; 3- Palato mole; 4- Base da língua; 5- Parede posterior; 6- Outros;99- Ignorado	30
31	Se outro Subsítio, descrever	Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	31
37	Metástase cervical	0- Não; 1- Sim; 88- Não se Aplica; 99- Ignorado	37
38	Metástase à distância	0- Não; 1- Sim; 88- Não se Aplica; 99- Ignorado	38
39	Se metástase à distância	1- Pulmão; 2- Osso; 3- Fígado; 4- SNC; 5- Outras; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	39
40	ECOG	0- 0; 1- 1; 2- 2; 3- 3; 4- 4; 5- 5; 99- Ignorado	40
DETALHES RADIOLOGICOS CT PRÉ TRATAMENTO			
41	Maior Diâmetro AXIAL do tumor	Em mm utilizando o PONTO como separador decimal se necessario	41

42	Soma do maior diâmetro AXIAL das duas maiores metástases cervical Em mm utilizando o PONTO como separador decimal se necessário	42	
INFORMAÇÕES DO TRATAMENTO			
43	Tratamento realizado 1- Cirurgia exclusiva; 2- Cirurgia + adjuvância; 3-Qt neo + radio e quimioterapia; 4- Radioterapia + quimioterapia	43	Checkbox
CIRURGIA			
44	Cirurgia 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	44	
45	Se cirurgia, qual? 1- Amigdalectomia; 2- Pelviglosectomia; 3- Bucofaringectomia; 4- Outra; 88- Não se Aplica; 99- Ignorado	45	
46	Se outra cirurgia, descrever Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	46	
47	Se cirurgia tipo de ressecção? 1- R0; 2- R1; 3- R2; 88- Não se Aplica; 99- Ignorado	47	
48	Data da cirurgia DD/MM/AAAA	48	__/__/____
49	Realizou esvaziamento cervical? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	49	
50	Se esvaziamento, qual? 1- SOH; 2- Radical Clássico ou modificado; 3- Outro	50	
51	Se outro esvaziamento, descrever Descrever; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	51	
52	Data do esvaziamento DD/MM/AAAA	52	
RESPOSTA RADIOLÓGICA			
53	Maior Diâmetro AXIAL do tumor de orofaringe Em mm utilizando o PONTO como separador decimal se necessário	53	
54	Soma do maior diâmetro AXIAL das duas maiores metástases cervical Em mm utilizando o PONTO como separador decimal se necessário	54	
55	Resposta radiológica 1- Progressão de doença (PD); 2- Doença estável (DE) - tumor que apresentou crescimento menor que 20% do diâmetro ou diminuição menor que 30%; 3- Resposta parcial (RP) -diminuição maior ou igual a 30% do diâmetro; 4- Resposta completa (RC) diminuição de 100% do diâmetro tumoral;99- Ignorado	55	
DETALHES RADIOLÓGICOS CT APÓS RADIOTERAPIA EXCLUSIVA (CASO TENHA SIDO UTILIZADA)			
56	Maior Diâmetro AXIAL do tumor Em mm utilizando o PONTO como separador decimal se necessário	56	
57	Soma do maior diâmetro AXIAL das duas maiores metástases cervical Em mm utilizando o PONTO como separador decimal se necessário	57	
58	Resposta radiológica 1- Progressão de doença (PD); 2- Doença estável (DE) - tumor que apresentou crescimento menor que 20% do diâmetro ou diminuição menor que 30%; 3- Resposta parcial (RP) -diminuição maior ou igual a 30% do diâmetro; 4- Resposta completa (RC) diminuição de 100% do diâmetro tumoral;99- Ignorado	58	
DETALHES RADIOLÓGICOS CT APÓS TRATAMENTO COMPLETO - RESPOSTA FINAL			
59	Maior Diâmetro AXIAL do tumor Em mm utilizando o PONTO como separador decimal se necessário	59	
60	Soma do maior diâmetro AXIAL das duas maiores metástases cervical Em mm utilizando o PONTO como separador decimal se necessário	60	
61	Resposta radiológica 1- Progressão de doença (PD); 2- Doença estável (DE) - tumor que apresentou crescimento menor que 20% do diâmetro ou diminuição menor que 30%; 3- Resposta parcial (RP) -diminuição maior ou igual a 30% do diâmetro; 4- Resposta completa (RC) diminuição de 100% do diâmetro tumoral;99- Ignorado	61	
IMUNOHISTOQUIMICA			
62	P16 1- Positivo; 2- Negativo; 99- Ignorado	62	
DESFECHO			
63	Apresentou recidiva até o momento? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	63	
64	Data do diagnóstico da recidiva DD/MM/AAAA	64	__/__/____
65	Status Atual 1- Vivo sem doença; 2- Vivo com doença; 3- Óbito por câncer; 4- Óbito por outras causas; 5- Perda de seguimento; 99- Ignorado	65	

66	Data da última informação DD/MM/AAAA	66	__/__/____
DADOS DO QUESTIONÁRIO			
67	Há quanto tempo mora nesta região Em meses utilizando o PONTO como separado decimal se necessário	67	
68	Alcool 0-Nunca bebeu; 1-Ex etilista; 2 Etilista atual	68	
69	Drinks diários Numero	69	
70	Tabagismo 0-Nunca fumou; 1-Ex tabagista; 2-Tabagista atual	70	
71	Se tabagista atual, qual o número de <u>anos fumados</u> Número utilizando o PONTO como separador decimal se necessário.	71	
72	Se tabagista atual ou ex tabagista, qual o número de <u>maços fumados ao dia</u> Número utilizando o PONTO como separador decimal se necessário.	72	
73	Se menos de 1 maço ao dia ex tabagista, <u>quantos cigarros ao dia</u> Número utilizando o PONTO como separador decimal se necessário.	73	
74	Se ex tabagista qual a idade de início Numero	74	
75	Se ex tabagista qual a idade que parou Numero	75	
76	Se ex tabagista qual Número de anos fumados Numero	76	
77	Se ex tabagista qual Número de anos fumados Numero	77	
78	Número de parceiros sexuais ao longo da vida Numero	78	
79	Número de parceiros em que você praticou sexo oral ativo ao longo da vida Numero	79	
80	Número de parceiros em que você praticou sexo oral passivo ao longo da vida Numero	80	

ANEXO C - Formulário

TÍTULO DO ESTUDO:

TUMORES DE OROFARINGE E SUA RELAÇÃO COM O HPV ENTRE DUAS REGIÕES BRASILEIRAS CULTURALMENTE DIFERENTES

PESQUISADORES:

Chrystiano Ferreira (Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII)

Dr^a. Rozany Dufloth (Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII)

Dr. Ricardo Gama (Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII)

Dr^a. Ana Carolina (Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII)

IDENTIFICAÇÃO / MORADIA

Nome: _____

RH: _____

Região onde mora

() Norte; () Nordeste; () Sul; () Sudeste; () Centro-oeste.

Há quanto tempo mora nesta região

() 0-4 anos; () 5-10 anos; () > 10 anos

CONSUMO DE ÀLCOOL

() Nunca bebeu; () Ex etilista; () Eilista atual

Número de drinks diários (1 drink equivale a uma lata de cerveja, ou a uma dose de bebida destilada ou a uma taça de vinho)

() <2 () 2-4 () acima de 4 dia

TABAGISMO

() Nunca fumou; () Ex tabagista; () Tabagista atua

Se tabagista atual

Número de anos fumando: _____

Número de maços fumados ao dia: _____

Se menos de 1 maço ao dia, quantos cigarros ao dia _____

Se ex tabagista

Idade de início _____

Idade que parou _____

Número de anos fumandos: _____

Numero de maços fumados ao dia: _____

Há quanto tempo parou de fumar: _____

Se menos de 1 maço ao dia, quantos cigarros ao dia _____

COMPORTEAMENTO SEXUAL

Número de parceiros sexuais ao longo da vida:

()0; ()1-3; ()4-10; ()>10

Número de parceiros em que você praticou sexo oral ativo ao longo da vida:

()0; ()1-3; ()4-10; ()>10

Número de parceiros em que você praticou sexo oral passivo ao longo da vida:

()0; ()1-3; ()4-10; ()>10

CAMPO DE ASSINATURAS

Nome por extenso do participante de
pesquisa ou do representante legal

Data

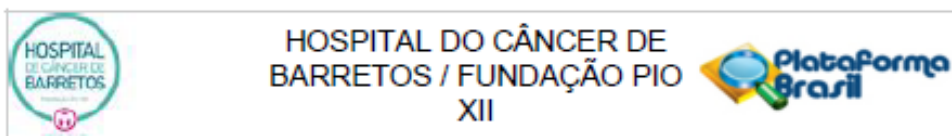
Assinatura

Nome por extenso do entrevistador

Data

Assinatura

ANEXO D - Carta de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: TUMORES DE OROFARINGE E SUA RELAÇÃO COM O HPV ENTRE DUAS REGIÕES BRASILEIRAS CULTURALMENTE DIFERENTES

Pesquisador: CHRYSTIANO DE CAMPOS FERREIRA

Área Temática:

Versão: 9

CAAE: 61350216.8.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Fundação Pio XII

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.159.016

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos denominados "apresentação do projeto", "objetivos" e "avaliação dos riscos e benefícios" foram retiradas do documento intitulado "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1279002_E3.pdf" (submetido na Plataforma Brasil em 06/02/2019)

RESUMO:

Os fatores de risco mais importantes para o câncer de cabeça e pescoço são o tabagismo e o etilismo; porém, muitos pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe não tem nenhum dos fatores de risco tradicionais relacionados com o câncer de cabeça e pescoço. A história natural da infecção do HPV na região de cabeça e pescoço não está bem esclarecida; porém, sabe-se que o HPV encontra-se presente em regiões de mucosa de cabeça e pescoço em uma taxa de 7% em indivíduos saudáveis (Gillison et al., 2012). Propomos um estudo para avaliar o perfil epidemiológico nos tumores de orofaringe, avaliando a presença do HPV, a resposta ao tratamento, bem como o prognóstico das lesões encontradas nas regiões norte e sudeste do Brasil.

INTRODUÇÃO:

1. INTRODUÇÃO Iniciamos o presente projeto de pesquisa fazendo uma busca no intuito de

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
UF: SP Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO
XII



Continuação do Parecer: 3.159.018

Investigador	Projetonovo.docx	04/12/2016 21:14:29	CHRYSIANO DE CAMPOS FERREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	04/12/2016 21:13:19	CHRYSIANO DE CAMPOS FERREIRA	Aceito
Outros	cartaresposta.pdf	04/12/2016 21:10:24	CHRYSIANO DE CAMPOS FERREIRA	Aceito
Outros	mabinovo.pdf	02/12/2016 16:11:26	CHRYSIANO DE CAMPOS FERREIRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEBIOBANCO.pdf	02/12/2016 16:10:29	CHRYSIANO DE CAMPOS FERREIRA	Aceito
Outros	RESPONSABILIDADE.PDF	25/10/2016 02:35:21	CHRYSIANO DE CAMPOS FERREIRA	Aceito
Outros	financiamento.PDF	25/10/2016 02:34:01	CHRYSIANO DE CAMPOS FERREIRA	Aceito
Outros	ciencia.PDF	25/10/2016 02:33:14	CHRYSIANO DE CAMPOS FERREIRA	Aceito
Outros	cadastro.pdf	25/10/2016 02:32:10	CHRYSIANO DE CAMPOS FERREIRA	Aceito
Folha de Rosto	ROSTO.pdf	25/10/2016 02:26:53	CHRYSIANO DE CAMPOS FERREIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 21 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Maicon Fernando Zanon da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata CEP: 14.784-400
UF: SP Município: BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 Fax: (17)3321-6600 E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

ANEXO E - termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

TÍTULO DO ESTUDO:

TUMORES DE OROFARINGE E SUA RELAÇÃO COM O HPV ENTRE DUAS REGIÕES BRASILEIRAS CULTURALMENTE DIFERENTES

PESQUISADORES:

Chrystiano Ferreira (Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII)

Dr^a. Rozany Dufloth (Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII)

Dr. Ricardo Gama (Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII)

Dr^a. Ana Carolina de Carvalho (Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII)

O QUE É ESTE DOCUMENTO?

Você está sendo convidado(a) a participar deste estudo que será realizado no Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII. Este documento é chamado de “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” e explica este estudo e qual será a sua participação, caso você aceite o convite. Este documento também fala os possíveis riscos e benefícios se você quiser participar, além de dizer os seus direitos como participante de pesquisa. Após analisar as informações deste Termo de Consentimento e esclarecer todas as suas dúvidas, você terá o conhecimento necessário para tomar uma decisão sobre sua participação ou não neste estudo. Não tenha pressa para decidir. Se for preciso, leve para a casa e leia este documento com os seus familiares ou outras pessoas que são de sua confiança.

POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO FEITO?

Existe um vírus denominado HPV (papiloma vírus humano) que está relacionado ao câncer de orofaringe (região da garganta). Como existem poucos estudos sobre este tema propomos este

estudo para comparar a prevalência (quantidade de pacientes com câncer de garganta com este vírus), resposta ao tratamento e prognóstico (previsão de evolução da doença) do HPV em duas regiões que tratam câncer de cabeça e pescoço em um mesmo país (Regiões Norte/Nordeste com as regiões Centro-oeste/Sul/sudeste), consideramos que este estudo proposto é inédito e potencialmente útil para ajudar nos tratamentos de futuros pacientes.

O QUE ESTE ESTUDO QUER SABER?

Avaliar as diferenças dos cânceres de orofaringe (região da garganta) das Regiões Norte/Nordeste com as regiões Centro-oeste/Sul/sudeste.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO DURANTE O ESTUDO?

1. Você será convidado a responder a algumas perguntas de um formulário. Estas perguntas são sobre seus hábitos como o tabagismo e consumo de álcool e sobre seu comportamento sexual
2. Será coletado no seu prontuário suas informações como (sexo, idade, cor, se é tabagista, como foi seu tratamento etc).
3. Será utilizado uma pequena quantidade do bloco de parafina da sua biópsia (pedaço do tumor que já foi retirado para ter dado o seu diagnóstico e que está guardado na fundação Pio XII). Os pesquisadores se comprometem a não esgotar o material proveniente de parafina para a pesquisa, ficando material suficiente disponível para testes futuros com finalidade de diagnóstico. Será pesquisado a presença ou ausência do vírus HPV além de realizar o estudo da ancestralidade do caso.

HAVERÁ ALGUM RISCO OU DESCONFORTO SE EU PARTICIPAR DO ESTUDO?

Sob o ponto de vista ético, o estudo confere risco mínimo, caracterizado pela quebra eventual de sigilo dos dados do paciente. Entretanto, os pesquisadores se comprometem a não divulgar esses dados e manter total sigilo;

HAVERÁ ALGUM BENEFÍCIO PARA MIM SE EU PARTICIPAR DO ESTUDO?

É possível que este estudo não traga benefícios diretos a você. Mas ao final desta pesquisa, as informações que ele gerar, poderão trazer benefícios a outras pessoas.

QUAIS SÃO OS MEUS DIREITOS SE EU QUISER PARTICIPAR DO ESTUDO?

Você tem direito a:

- 1) Receber as informações do estudo de forma clara;
- 2) Ter oportunidade de esclarecer todas as suas dúvidas;
- 3) Ter o tempo que for necessário para decidir se quer ou não participar do estudo;
- 4) Ter liberdade para recusar a participação no estudo, e isto não trará qualquer de problema para você;
- 5) Ter liberdade para desistir e se retirar do estudo a qualquer momento;
- 6) Ter assistência a tudo o que for necessário se ocorrer algum dano por causa do estudo, de forma gratuita, pelo tempo que for preciso;
- 7) Ter direito a reclamar indenização se ocorrer algum dano por causa do estudo;
- 8) Ser ressarcido pelos gastos que você e seu acompanhante tiverem por causa da participação na pesquisa, como por exemplo, transporte e alimentação;
- 9) Ter acesso aos resultados dos exames realizados durante o estudo;
- 10) Ter respeitado o seu anonimato (confidencialidade);
- 11) Ter respeitada a sua vida privada (privacidade);
- 12) Receber uma via deste documento, assinada e rubricada em todas as páginas por você e pelo pesquisador;
- 13) Ter liberdade para não responder perguntas que incomodem você;
- 14) Ter liberdade para retirar o consentimento para que usem ou guardem o guarda material biológico que foi removido de você;

O estudo só poderá ser suspenso após a anuência do CEP que aprovou a realização da pesquisa, a menos que o encerramento se dê por razões de segurança. Nesse caso, o estudo poderá ser descontinuado sem prévia análise do CEP.

SE EU TIVER DÚVIDAS SOBRE OS MEUS DIREITOS OU QUISER FAZER UMA RECLAMAÇÃO, COM QUEM EU FALO?

Fale diretamente com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos. Este comitê é formado por pessoas que analisam a parte ética dos estudos e autorizam ele acontecer ou não. Você pode entrar em contato com este Comitê por telefone (tel: (17) 3321-0347 ou (17) 3321-6600 - ramal 6647), email (cep@hcancerbarretos.com.br) carta (Rua Antenor Duarte Vilela, 1331, Instituto de Ensino e Pesquisa, 14784-057) ou pessoalmente. O horário de atendimento é de 2ª a 5ª feira, das 8h00 às 17h00, e 6ª feira, da 8h00 às 16h00. O horário de almoço é de 12h00 às 13h00.

SE EU TIVER DÚVIDAS SOBRE O ESTUDO, COM QUEM EU FALO?

Fale diretamente com o pesquisador responsável. As formas de contato estão abaixo:

Nome do pesquisador: Chrystiano Ferreira

Formas de contato: (69) 81190225

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu entendi o estudo. Tive a oportunidade de ler o Termo de Consentimento ou alguém leu para mim. Tive o tempo necessário para pensar, fazer perguntas e falar a respeito do estudo com outras pessoas. Autorizo a minha participação na pesquisa. Ao assinar este Termo de Consentimento, não abro mão de nenhum dos meus direitos. Este documento será assinado por mim e pelo pesquisador, sendo todas as páginas rubricadas por nós dois. Uma via ficará comigo, e outra com o pesquisador.

CAMPO DE ASSINATURAS

Nome por extenso do participante de pesquisa
ou do representante legal

Data

Assinatura

Nome por extenso do pesquisador

Data

Assinatura

Nome por extenso da testemunha imparcial
(para casos de analfabetos, semi-analfabetos
ou portadores de deficiência visual)

Data

Assinatura

RESEARCH ARTICLE

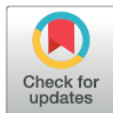
Correlation of p16 immunohistochemistry with clinical and epidemiological features in oropharyngeal squamous-cell carcinoma

Chrystiano de C. Ferreira^{1,2*}, Rozany Dufloth^{3,4}, Ana C. de Carvalho⁵, Rui M. Reis^{5,6}, Iara Santana⁷, Raiany S. Carvalho¹, Ricardo R. Gama¹

1 Department of Head and Neck Surgery, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil, **2** Department of Medicine, Federal University of Rondônia, Rondônia, Brazil, **3** Institute of Anatomical Pathology, Rede D'Or São Luiz Hospitals Network, São Paulo, Brazil, **4** Department of Medicine, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, Brazil, **5** Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil, **6** Life and Health Sciences Research Institute, Medical School, University of Minho, Braga, Portugal, **7** Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, Brazil

✉ These authors contributed equally to this work.

* chrystiano_campos@yahoo.com.br



OPEN ACCESS

Citation: de C. Ferreira C, Dufloth R, de Carvalho AC, Reis RM, Santana I, Carvalho RS, et al. (2021) Correlation of p16 immunohistochemistry with clinical and epidemiological features in oropharyngeal squamous-cell carcinoma. PLoS ONE 16(6): e0253418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253418>

Editor: Jeffrey S. Chang, National Health Research Institutes, TAIWAN

Received: February 15, 2021

Accepted: June 3, 2021

Published: June 17, 2021

Copyright: © 2021 de C. Ferreira et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its [Supporting Information](#) files.

Funding: There is no specific fund that financed the study.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Oropharyngeal cancer is an important public health problem. The aim of our study was to correlate p16 immunohistochemistry in oropharynx squamous cell carcinomas (OPSCC) with clinical and epidemiological features.

Material and methods

We conducted a cross-sectional study on patients with OPSCC treated at a single institution from 2014 to 2019. Epidemiological and clinical-pathological data were collected from medical records and a questionnaire was applied to determine alcohol consumption, smoking, and sexual behavior. The HPV status was determined by p16 immunohistochemistry.

Results

A total of 252 patients participated in the study, of these 221 (87.7%) were male. There were 81 (32.14%) p16 positive cases and 171 (67.85%) p16 negative cases. The p16 positive group was significantly associated with younger patients (50–59 years), higher education level, lower clinical stage and patients who never drank or smoked. Through univariate logistic regression, we observed that female sex (OR, 3.47; 95% CI, 1.60–7.51) and higher education level (OR, 9.39; 95% CI, 2.81–31.38) were significantly more likely to be p16 positive. Early clinical stage (AJCC8ed) was more associated with p16 positivity both in univariate (OR, 0.14; 95% CI, 0.07–0.26, $p < 0.001$) and multivariate analysis (OR, 0.18; 95% CI, 0.06–0.49, $p = 0.001$).

Conclusion

This study showed that drinkers and current smokers were less likely to be p16+. Female sex, higher education level and younger age at diagnosis were associated with a higher

probability of being p16+. Additionally, there was a higher proportion of patients with early clinical stage (I or II) in the p16 positive group when compared to the p16 negative group.

Introduction

Oropharyngeal cancer is an important public health problem. According to GLOBOCAN 2018 [1], it represents 0.5% (92,887) of the total number of new cancer cases and 0.5% (51,005) of the total number of cancer deaths.

Drinking and smoking are considered serious risk factors in oropharyngeal carcinogenesis [2–4]. However, in recent decades, another important etiological factor for oropharynx squamous cell carcinomas (OPSCC) has been discovered: human papillomavirus (HPV). The prevalence of HPV in oropharyngeal tumours varies according to the year of study, population studied and method of analysis. In recent decades, HPV prevalence in these tumours has been increasing globally and are found to be more prevalent in developed countries than in developing ones [5, 6].

HPV status can be determined by several methods but, clinically, immunohistochemistry for the p16 protein has shown several benefits as it is practical, simple and inexpensive [7, 8]. Several important international guidelines, such as the National Comprehensive Cancer Network [9] and the guidelines of the American College of Pathologists [10], recommend the clinical use of p16 by immunohistochemistry to characterize cases such as HPV⁺ or HPV⁻. Additionally, the staging of oropharyngeal tumours changed in the 8th edition of the AJCC [11, 12].

The aim of our study was to correlate the p16 immunohistochemistry in OPSCC with clinical and epidemiological features.

Material and methods

We conducted a cross-sectional study of 252 patients diagnosed with OPSCC, treated at a single tertiary referral institution for cancer treatment in Brazil from 2014 to 2019. Demographic data (sex, age, marital status) and clinical-pathological data (TNM clinical stage according to the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM staging system) were obtained from medical records. Of the 252 patients in the study, 125 answered a questionnaire on sexual behavior, smoking and alcohol consumption habits.

HPV status was determined in all patients by p16 immunohistochemistry, which is a well-established surrogate marker to characterize HPV⁺ oropharyngeal tumours [10]. Briefly, the paraffin blocks from the biopsy or surgery of the patients were separated, and the most representative areas of these blocks containing the tumours were selected and sliced into 4- μ m sections. Immunohistochemistry was performed using the CINtec[®] p16 Histology kit (Roche MTM Laboratories, Heidelberg, Germany), according to the manufacturer's instructions. The expression of p16 was classified as positive in the presence of strong and diffuse staining in more than 75% of both nuclei and cytoplasm. Any other colour pattern was classified as negative (Fig 1) [13–15]. Thus, patients with p16 positivity by immunohistochemistry were considered to be HPV⁺ [16, 17].

Ethical approval

The study was approved by the Medical Ethics Committee of the Barretos Cancer Hospital under number 1,943,689. Written informed consent was obtained from all patients who were enrolled in this study.

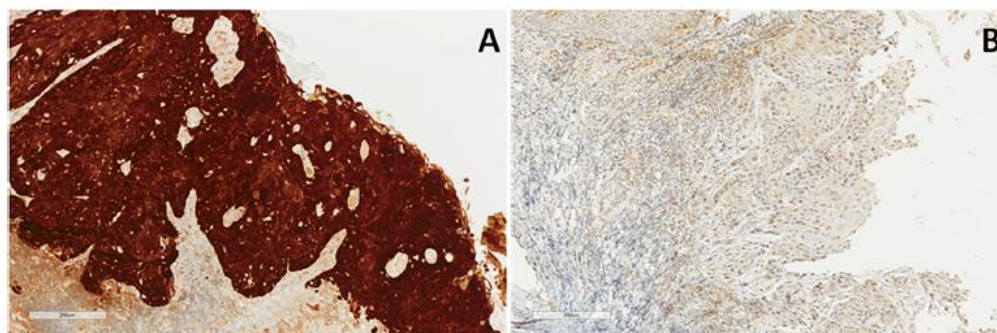


Fig 1. Representative photomicrograph of p16 expression (immunohistochemistry). 10x magnification. A: Oropharynx squamous cell carcinoma with p16-positive immunohistochemistry. B: Oropharynx squamous cell carcinoma with p16-negative immunohistochemistry.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253418.g001>

Statistical analysis

The analyses were performed using the software SPSS version 21 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois). The sociodemographic and clinical characteristics based on HPV status were analysed using the chi-squared test (or Fisher's exact test) when the variables were qualitative and the Mann-Whitney test for quantitative variables. A p-value < 0.05 was considered statistically significant. To verify the relationships between the studied variables and HPV positivity, multivariate logistic regression was used to estimate the odds ratio (OR) and its respective 95%.

Results

In the period from 2014 to 2019, we included a total of 252 patients diagnosed with OPSCC-treated at our institution. The sociodemographic and clinical pathological characteristics are summarised in [Table 1](#). The majority were male (221 = 87.69%), and the most frequent age group was 50–59 years, with 85 (33.7%) cases.

Data analysis showed that 30 (12.93%) patients were illiterate, 134 (57.75%) completed elementary school, 41 (17.67%) completed high school, and 27 (11.63%) completed higher education. The results for skin colour showed that 142 (58.43%) of the patients self-reported as white while 101 (41.56%) patients self-reported as non-white (brown, black, Asian, indigenous). The findings on marital status showed that 18.79% (133/233) of the patients had a fixed partner (married or in a stable union), 21.46% (50/233) had no fixed partner (widowed or separated), and 21.46% (50/233) were single.

A total of 81 (32.1%) patients tested positive for p16 staining while 171 (67.85%) tested negative.

Although a lower number of women participated in the study, it should be highlighted that the probability of oropharyngeal cancer in women being HPV induced based on the p16 status is higher than when a man is diagnosed with oropharyngeal cancer.

In the p16⁺ group, the patients were younger, with a predominant age range of 50–59 years compared to a predominance of 60–69 years in the other group ($P = 0.005$). No significant differences regarding ethnicity were observed. The p16 positive patients showed significant higher education level (24.7% vs. 4.6%, $P < 0.001$), and a higher proportion of patients who finished high school (23.5% vs. 14.6%, $P < 0.001$). In the p16 negative group, a greater proportion of individuals were illiterate (15.2% vs. 8.6%, $P < 0.001$).

Table 1. Associations of p16 expression with the epidemiological characteristics of the patients.

Variables	P16				P-value
	Negative		Positive		
	n	(%)	n	(%)	
Sex^a					
Male	158	92.4%	63	77.8%	0.01*
Female	13	7.6%	18	22.2%	
Age^b					
20–29	1	6.1%	0	0.0%	0.005*
30–39	1	6.1%	3	3.7%	
40–49	27	15.8%	25	30.9%	
50–59	54	31.6%	31	38.3%	
60–69	57	33.3%	15	18.5%	
70–79	22	12.9%	6	7.4%	
80–89	8	4.7%	1	1.2%	
90–99	1	0.6%	0	0.0%	
Skin colour^a					
White	92	55.4	50	64.9	0.16
Non-white	74	44.6	27	35.1	
Schooling^a					
Illiterate	23	15.2%	7	8.6%	0.001*
Elementary school	99	65.6%	35	43.2%	
High school	22	14.6%	19	23.5%	
Higher	7	4.6%	20	24.7%	
T^a					
T1/T2	53	31.5%	33	42.3%	0.100
T3/T4	115	68.5%	45	57.7%	
N^a					
N0	41	24.4%	17	21.8%	0.654
N positive	127	75.6%	61	78.2%	
M^b					
M0	161	95.8%	72	92.3%	0.357
M1	7	4.2%	6	7.7%	
TNM staging^a					
Early-stage I and II	22	13.1	41	52.6%	0.001*
Advanced III and IV	146	86.9%	37	47.4%	

^a Analysis by the chi-squared test expressed as absolute (n) and relative (%) frequency

^b Analysis by Fisher's exact test expressed as absolute (n) and relative (%) frequency

* Statistically significant difference $P \leq 0.05$

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253418.t001>

No significant differences in relation to T, N, or M stage were identified. However, in the p16negative group, there was a higher number of patients with advanced clinical stage (III or IV) (86.9% vs. 47.4%) and a greater proportion of patients in the p16 positive group with early clinical stage (I or II) (13.1 vs. 52.6, $P < 0.001$) (Table 1).

Analysis of the questionnaires on patient habits showed a much higher prevalence of patients who never drank in the p16 positive group than in the p16 negative group (16% vs. 2.7%, $P = 0.015$). Similarly, the number of patients who never smoked in the p16 positive group was more predominant compared to the p16 negative group (32% vs. 6.7%, $P < 0.001$) (Table 2).

Table 2. Data from the questionnaire related to smoking, alcohol consumption and sexual behavior.

Variables	p16				P-value
	Negative		Positive		
	n	(%)	n	(%)	
Alcohol^b					
Never drank	2	2.7%	8	16.0%	0.015*
Ex-drinker	46	61.3%	22	44.0%	
Current drinker	27	36.0%	20	40.0%	
Smoking^a					
Never smoked	5	6.7%	16	32.0%	0.001*
Ex-smoker	34	45.3%	18	36.0%	
Current smoker	36	48.0%	16	32.0%	
Number of sexual partners throughout life^d					
None	0	0.0%	0	0.00%	0.362
1 to 3	12	16.0%	10	20.0%	
4 to 10	27	36.0%	12	24.0%	
>10	36	48.0%	28	56.0%	
Number of partners with whom the patient practised active oral sex throughout life^b					
None	37	50.7%	15	30.0%	0.126
1 to 3	27	37.0%	24	48.0%	
4 to 10	4	5.5%	5	10.0%	
>10	5	6.8	6	12.0%	
Number of partners with whom the patient practised passive oral sex throughout life					
None	29	39.2%	9	18.0%	0.55
1 to 3	29	39.2%	22	44.0%	
4 to 10	8	10.8	11	22.0%	
>10	8	10.8	8	16.0%	

^a Analysis by the chi-squared test expressed as absolute (n) and relative (%) frequency

^b Analysis by Fisher's exact test expressed as absolute (n) and relative (%) frequency

* Statistically significant difference

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253418.t002>

From the data, no significant differences were observed in the number of sexual partners throughout life, nor in the number of partners with whom the patients practised either passive or active oral sex (Table 2).

Through univariate logistic regression, we determined that female sex (OR, 3.47; 95% CI, 1.60–7.51) and higher education level (OR, 9.39; 95% CI, 2, 81–31,38) were significantly related to a higher probability of being p16 positive. Current alcohol drinking (OR, 0.14; 95% CI, 0.04–0.44) and current smoking (OR, 0.14; 95% CI, 0.04–0.44) were less associated with p16 positivity in univariate analysis. (Table 3). Early clinical stage was more associated with p16 positivity both in univariate (OR, 0.14; 95% CI, 0.07–0.26, $p < 0.001$) and in multivariate analysis (OR, 0.18; 95% CI, 0.06–0.49, $p = 0.001$).

Discussion

In the present study, we found that p16 positive oropharyngeal squamous-cell carcinoma was more common in patients who never drank, never smoked, in those with a higher educational level and was associated with tumours presenting in early clinical stage (I and II).

Table 3. Model of the univariate and multivariate analysis of sociodemographic data based on p16 status.

Variables	Odds ratio	Univariate			p-value	Multivariate			
		Confidence Interval for Odds Ratio		p-value		Odds ratio	Confidence Interval for Odds Ratio		p-value
		Lower	Higher				Lower	Higher	
Sex									
Male	1	-	-		1	-	-		
Female	3.473	1.606	7.506	0.002	3.872	0.808	18.558	0.09	
Alcohol									
Never drank	1	-	-	0.032	1	-	-	0.227	
Ex-drinker	0.120	0.023	0.611	0.011	0.297	0.037	2.356	0.25	
Current drinker	0.186	0.186	0.035	0.046	0.593	0.065	5.372	0.642	
Smoking									
Never smoked	1	-	-	0.003	1	-	-	0.246	
Ex-smoker	0.165	0.052	0.525	0.002	0.283	0.064	1.242	0.094	
Current smoker	0.139	0.043	0.445	0.001	0.354	0.077	1.62	0.181	
Education									
Illiterate	1	-	-	< 0,001	1	-	-	0.295	
elementary school	1.182	0.458	2.943	0.752	1.537	0.451	5.234	0.492	
high school	2.838	0.998	8.071	0.051	2.984	0.652	13.665	0.159	
higher	9.388	2.808	31.385	< 0,001	4.3	0.716	25.837	0.111	
CS									
Early-stage	1	-	-	-	1	-	-		
Advanced	0.136	0.072	0.256	< 0,001	0.182	0.067	0.492	0.001	

Reference: p16+

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253418.t003>

The majority of studies relating HPV to OPSCC do not follow standardised methods and, consequently, several authors use different diagnostic methods for HPV (p16, PCR), resulting in varied prevalence rates. In addition, the prevalence depends on the population studied and the year of the study. In this research, we considered p16 immunohistochemistry as a marker for HPV status in all patients.

One of the differentials of our study is the application of a questionnaire on sexual behavior and consumption of alcohol and tobacco. Although a difference between p16 positive and p16 negative patients regarding sexual behavior was not detected, some studies demonstrate the opposite. D'Souza et al. [18] determined that a history of 6 or more oral sex partners was associated with a greater risk of OPSCC, D'Souza et al. found that a number of vaginal sex partners (≥ 26 compared to 0–5) was associated with a greater risk of OPSCC among men and the studies of Baumeister et al. [19] and Dahlstrom et al. [20] found the same result. Our findings are corroborated by other authors: Talamini et al. [21], Garrote et al. [22] and Smith et al. [23] who did not find a significant association between lifetime number of sexual partners and the risk of oral cancer.

Our study showed a 32.14% prevalence of p16 positivity in oropharyngeal carcinomas. Most studies involving populations from developing countries identified a low incidence of HPV in oropharyngeal tumours [24, 25]. López et al. [26] reported an incidence of 6.6% in Brazil and Anantharaman et al. [6] compared cases from the USA, Europe, and Brazil and found an incidence of only 4.1% of positivity in the population studied in Brazil. Petito et al. [16] studied 82 cases in Brazil and found an incidence of 25.6%, Betiol et al. [27] found 17.7% and de Cicco et al. [28] reported 59.1%. A more recent study in a developing country was that

of Bahl et al. [29] who found a 22.8% incidence of HPV in oropharyngeal tumours in India. In developed countries, Nasman et al. [30] studied 98 patients with oropharyngeal cancer in Sweden and found an HPV incidence of 79%.

Most of the patients in our study, in both p16⁺ and p16⁻ groups, had advanced clinical stage (III or IV). However, specifically in the p16⁺ group, there was a proportionally larger number of patients with early clinical stages (I and II) compared to the p16⁻ group (52.6% vs. 13.1%, $P < 0.001$). De Cicco et al. [28] and Du et al. [31] reported similar results.

Based on the biological behavior of induced HPV oropharyngeal cancer, there was a change in staging in the eighth edition, generating its own staging for the positive p16. This made it possible to perform a downstage of this population in comparison with the negative p16. Therefore, what is seen in the results are tumours that are now considered to be initial due to the new staging, which is inherent in the staging, which better reflects the positive p16 neoplasia and its consequent better prognosis.

According to Vokes et al. [32] this difference in prognosis by p16 immunohistochemical status was considered in the change in staging that occurred between the 7th and 8th edition of the TNM. In the seventh, only T1 or T2 N0 and M0 were considered early-stage tumours, regardless of their HPV status. In the eighth edition, the HPV-negative tumours continued to be considered early stage T1 or T2 N0 and M0, but among the HPV⁺ tumors, T3 and N2 were also considered early stage. Although the 8th edition of the TNM staging manual separates the staging of oropharyngeal squamous-cell carcinomas according to HPV positivity, the treatment for HPV-associated oropharyngeal carcinomas remains the same for HPV⁻ tumours, except in clinical trials [32].

In Table 4, we observe the differences between the 7th and 8th edition of the TNM (Table 4) and in particular that in the positive p16 all T3 / N2 are stage II, all T4 / N3 are stage III and stage IV only for M1.

In both the univariate and multivariate analyses in our study, patients with advanced clinical stages (III and IV) were less likely to be p16⁺. This finding does not corroborate with that of Mehanna et al. [33]. On the other hand, no association was observed in our study between tumour size or the presence of cervical or distant metastases and positivity to p16. Our findings corroborate those found by López et al. [26]

Our findings showed a greater predominance of patients who had never smoked in the p16⁺ group than in the p16⁻ group (32% vs. 6.7%, $P < 0.001$). López et al. [26] reported a proportion of 14.3% of patients who never smoked among the HPV⁺ patients and 3.4% among the HPV⁻ patients. Additionally, a higher proportion of current smokers among HPV⁻ patients

Table 4. Major changes from the seventh to the eighth editions of TNM [12].

Edition of TNM	Main characteristics
7Th edition	1- presence of T0 and Tis
	2- no emphasis on extra-capsular extension
	3- division of T4 into a and b
	4- stage IV for disease T4, N2, N3 and M1
	5- number of metastatic lymph nodes differed from N2a to N2b
8Th edition	1- absence of T0 in negative p16 and absence of Tis for positive p16
	2- creation of extra-capsular extension (N3b) only for 16 negatives
	3- absence of T4b for positive p16
	4- stage IV only for M1 disease in positive p16 5- without distinction of number of lymph nodes in positive p16

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0253418.t004>

was observed (69.8% vs. 57.1%). The study by Bahl et al. [29] also identified a higher proportion of patients who had never smoked in the HPV⁺ group (17% vs. 11%), but this was not statistically significant ($p = 0.86$). Other studies have also found a difference in the prevalence of p16 immunohistochemistry positivity with smoking status [24, 28]. In clinical practice, we observed that this difference is explained by the etiology of HPV⁻ cases, most of which are related to drinking and smoking.

Although we only analysed 125 of the 252 patients who answered the questionnaire on smoking habits, alcohol consumption, and sexual behavior, the smoking and alcohol consumption variables were statistically significant. There was a higher prevalence of patients who never drank in the p16⁺ group than in the p16⁻ group (16% vs. 2.7%, $P = 0.015$). De Cicco et al. [28] and López et al. [26] found similar results. In comparison, Bahl et al. [29] did not find evidence of a correlation between alcohol consumption and HPV positivity ($P = 0.18$).

There was a greater predominance of males in the p16⁻ group (92.4% vs. 77.8%, $P = 0.01$) and this finding is in agreement with those reported by López et al. [26] Petito et al. [16] the ICON-S study [34], Bahlet al. [29] and De Cicco et al. [28]. In most cases, males are more likely to have tumours of the head and neck, mainly due to their greater exposure to alcohol and smoking compared to women. The same result was found in the p16⁻ group.

Although most patients were male in both the HPV⁺ and HPV⁻ groups, the probability of a woman being HPV⁺ was greater than being HPV⁻ negative.

The age of the patients in the study ranged from 26 to 98 years, with a mean of 60.5 years. The most frequent age group was 50–59 years, with 85 (33.73%) patients. In the p16⁺ group, the patients were younger, with a predominant age range of 50–59 years vs. 60–69 years in the p16⁻ group ($P = 0.005$). The data of our study is in agreement with the worldwide literature which shows that HPV⁺ tumours affect younger patients [16, 29]. In contrast, de Cicco did not find significant differences in age between HPV⁺ and HPV⁻ patients [28].

As regards education level, the group with p16⁺ immunohistochemical examination had more patients with higher education (24.7% vs. 4.6%, $P < 0.001$) and patients with a high-school education (23.5% vs. 14.6%, $P < 0.001$). In the p16⁻ group, there was a greater proportion of individuals who were illiterate or who could only read and write (15.2% vs. 8.6%, $P < 0.001$). Our results corroborate worldwide literature which correlates HPV⁺ oropharyngeal tumours with patients with higher educational levels [35, 36].

The following variables were not statistically significant in our study: number of sexual partners throughout life and number of partners with whom the patients practiced either passive or active oral sex. These findings are not in accordance with the current literature, where sexual behavior is correlated with HPV positivity [10, 29, 37–41]. It is possible that our patients were more reticent about answering questions on sexual behavior due to embarrassment or shyness.

In our study we found that drinkers and current smokers had a lower chance of having a p16⁺ immunohistochemical test. Female sex and higher education level were associated with a higher probability of a p16⁺ immunohistochemical test. We did not find any correlation between the number of sexual partners throughout life or number of partners with whom the patient practiced oral sex (passive or active) throughout life and p16⁺ immunohistochemical test. These results are relevant because they demonstrate that p16-positive oropharyngeal tumours have a different epidemiological profile. Based on its biological behavior and clinical presentation, HPV⁺ oropharyngeal tumour is a pathology that requires further study and broader understanding in order to better optimize and stratify the care and treatment of patients with oropharyngeal cancer.

Supporting information

S1 File.
(XLSX)

Acknowledgments

We thank Barretos Cancer Hospital. We are also thankful to the Nucleus of Epidemiology and Statistics of Barretos Cancer Hospital for its support in statistical analysis.

Author Contributions

Conceptualization: Chrystiano de C. Ferreira, Rozany Dufloth, Ana C. de Carvalho, Iara Santana, Raiany S. Carvalho, Ricardo R. Gama.

Data curation: Chrystiano de C. Ferreira, Rozany Dufloth, Raiany S. Carvalho.

Formal analysis: Chrystiano de C. Ferreira, Rozany Dufloth, Ana C. de Carvalho, Ricardo R. Gama.

Funding acquisition: Rozany Dufloth.

Investigation: Chrystiano de C. Ferreira, Rozany Dufloth, Ana C. de Carvalho, Iara Santana, Ricardo R. Gama.

Methodology: Chrystiano de C. Ferreira, Rozany Dufloth, Ana C. de Carvalho, Iara Santana, Ricardo R. Gama.

Project administration: Rozany Dufloth, Ricardo R. Gama.

Resources: Rozany Dufloth, Iara Santana.

Supervision: Rozany Dufloth, Ana C. de Carvalho, Rui M. Reis, Iara Santana, Raiany S. Carvalho, Ricardo R. Gama.

Validation: Chrystiano de C. Ferreira.

Writing – original draft: Chrystiano de C. Ferreira, Ana C. de Carvalho.

Writing – review & editing: Chrystiano de C. Ferreira, Rozany Dufloth, Ana C. de Carvalho, Rui M. Reis, Raiany S. Carvalho, Ricardo R. Gama.

References

1. Bray F., et al., Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, 2018. 68(6): p. 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492> PMID: 30207593
2. INCA, Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Jose Alencar Gomes da Silva instituto nacional do câncer. 2019, Rio de Janeiro, RJ: INCA.
3. Wyss A., et al., Cigarette, cigar, and pipe smoking and the risk of head and neck cancers: pooled analysis in the international head and neck cancer epidemiology consortium. *Am J Epidemiol*, 2013. 178(5): p. 679–90. <https://doi.org/10.1093/aje/kwt029> PMID: 23817919
4. Gorphe P., et al., Smoking and papillomavirus DNA in patients with p16-positive N3 oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2019. 41(4): p. 1039–1045. <https://doi.org/10.1002/hed.25523> PMID: 30552841
5. Chaturvedi A.K., et al., Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*, 2011. 29(32): p. 4294–301. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.36.4596> PMID: 21969503

6. Anantharaman D., et al., Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer. *Int J Cancer*, 2017. 140(9): p. 1968–1975. <https://doi.org/10.1002/ijc.30608> PMID: [28108990](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28108990/)
7. Robinson M., et al., HPV specific testing: a requirement for oropharyngeal squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Pathol*, 2012. 6 Suppl 1(Suppl 1): p. S83–S90. <https://doi.org/10.1007/s12105-012-0370-7> PMID: [22782227](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22782227/)
8. Fakhry C., et al., Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: ASCO clinical practice guideline endorsement of the college of American pathologists guideline. *J Clin Oncol*, 2018. 36(31): p. 3152–3161. <https://doi.org/10.1200/JCO.2018.00684> PMID: [30188786](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30188786/)
9. National Comprehensive Cancer Network. Head and neck cancer (version 2.2020). 2020 August 18, 2020]; Available from: https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf.
10. Lewis J.S., et al., Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: guideline from the college of American pathologists. *Arch Pathol Lab Med*, 2018. 142(5): p. 559–597. <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0286-CP> PMID: [29251996](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29251996/)
11. Lydiatt W., Ridge J., and Patel S., Oropharynx (p16-) and hypopharynx, in *AJCC cancer staging manual*, Amin M., Editor. 2017, Springer: New York. p. 123.
12. O'Sullivan B., Lydiatt W., and Haughey B., HPV-mediated (p16+) oropharyngeal cancer, in *AJCC cancer staging manual*, Amin M., Editor. 2017, Springer: New York. p. 113.
13. Jordan R.C., et al., Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol*, 2012. 36(7): p. 945–54. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318253a2d1> PMID: [22743284](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22743284/)
14. Larsen C.G., et al., Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer*, 2014. 110(6): p. 1587–94. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.42> PMID: [24518594](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24518594/)
15. Possati-Resende J.C., et al., The accuracy of p16/Ki-67 and HPV test in the detection of CIN2/3 in women diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoS One*, 2015. 10(7): p. e0134445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134445> PMID: [26230097](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26230097/)
16. Petito G., et al., Human papillomavirus in oral cavity and oropharynx carcinomas in the central region of Brazil. *Braz J Otorhinolaryngol*, 2017. 83(1): p. 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2016.01.004> PMID: [27117892](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27117892/)
17. Posner M.R., et al., Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial. *Ann Oncol*, 2011. 22(5): p. 1071–1077. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdr006> PMID: [21317223](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21317223/)
18. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *New England J Med* 2007; 356:1944–56. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065497> PMID: [17494927](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17494927/)
19. Baumeister P, Reiter M, Welz C, Becker S, Betz C, Harreus U. Surgically treated oropharyngeal cancer: risk factors and tumor characteristics. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014; 140:1011–9. <https://doi.org/10.1007/s00432-014-1631-5> PMID: [24615330](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24615330/)
20. Dahlstrom KR, Li G, Tortolero-Luna G, Wei Q, Sturgis EM. Differences in history of sexual behavior between patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma and patients with squamous cell carcinoma at other head and neck sites. *Head Neck* 2011; 33:847–55. <https://doi.org/10.1002/hed.21550> PMID: [20737488](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20737488/)
21. Talamini R, Vaccarella S, Barbone F, Tavani A, La Vecchia C, Herrero R et al. Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. *Br J Cancer* 2000; 83:1238–42 <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1398> PMID: [11027440](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11027440/)
22. Garrote LF, Herrero R, Reyes RM, Vaccarella S, Anta JL, Ferbeyre L et al. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *Br J Cancer* 2001; 85:46–54. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2000.1825> PMID: [11437401](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11437401/)
23. Smith EM, Hoffman HT, Summersgill KS, Kirchner HL, Turek LP, Haugen TH. Human papillomavirus and risk of oral cancer. *Laryngoscope* 1998; 108:1098–103 <https://doi.org/10.1097/00005537-199807000-00027> PMID: [9665264](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9665264/)
24. Mehanna H., et al., Geographic variation in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer: data from 4 multinational randomized trials. *Head Neck*, 2016. 38 Suppl 1(Suppl 1): p. E1863–E9. <https://doi.org/10.1002/hed.24336> PMID: [26749143](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26749143/)
25. Caley A., et al., Multicentric human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 2015. 37(2): p. 202–8. <https://doi.org/10.1002/hed.23584> PMID: [24375667](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24375667/)

26. Lopez R.V., et al., Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. *Cancer Causes Control*, 2014. 25(4): p. 461–71. <https://doi.org/10.1007/s10552-014-0348-8> PMID: 24474236
27. Betiol J.C., et al., Prevalence of human papillomavirus types and variants and p16(INK4a) expression in head and neck squamous cells carcinomas in Sao Paulo, Brazil. *Infect Agent Cancer*, 2016. 11: p. 20. <https://doi.org/10.1186/s13027-016-0067-8> PMID: 27148398
28. de Cicco R., et al., Impact of human papillomavirus status on survival and recurrence in a geographic region with a low prevalence of HPV-related cancer: a retrospective cohort study. *Head Neck*, 2020. 42(1): p. 93–102. <https://doi.org/10.1002/hed.25985> PMID: 31633252
29. Bahl A., et al., Prevalence and trends of human papillomavirus in oropharyngeal cancer in a predominantly north Indian population. *Head Neck*, 2014. 36(4): p. 505–10. <https://doi.org/10.1002/hed.23317> PMID: 23729189
30. Nasman A., et al., Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*, 2009. 125(2): p. 362–6. <https://doi.org/10.1002/ijc.24339> PMID: 19330833
31. Du E., et al., Long-term Survival in Head and Neck Cancer: Impact of Site, Stage, Smoking, and Human Papillomavirus Status. *Laryngoscope*, 2019. 129(11): p. 2506–2513. <https://doi.org/10.1002/lary.27807> PMID: 30637762
32. Vokes E.E., Agrawal N., and Seiwert T. Y., HPV-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*, 2015. 107(12): p. djv344. <https://doi.org/10.1093/jnci/djv344> PMID: 26656751
33. Mehanna H., et al., Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer—systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck*, 2013. 35(5): p. 747–55. <https://doi.org/10.1002/hed.22015> PMID: 22267298
34. O'Sullivan B., et al., Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol*, 2016. 17(4): p. 440–451. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00560-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00560-4) PMID: 26936027
35. Gillison M.L., et al., Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. *JAMA*, 2012. 307(7): p. 693–703. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.101> PMID: 22282321
36. Dahlstrom K.R., 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): p. 832–8. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.06.005> PMID: 26120093
37. Ribeiro K.B., 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(2): p. 489–502. <https://doi.org/10.1093/ije/dyq249> PMID: 21224273
38. Gillison M.L., et al., 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(6): p. 407–20. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn025> PMID: 18334711
39. D'Souza G., et al., Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 2007. 356(19): p. 1944–56. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065497> PMID: 17494927
40. D'Souza G., et al., Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis*, 2009. 199(9): p. 1263–9. <https://doi.org/10.1086/597755> PMID: 19320589
41. Read T.R., et al., Oral human papillomavirus in men having sex with men: risk-factors and sampling. *PLoS One*, 2012. 7(11): p. e49324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049324> PMID: 23173054

ANEXO G – Artigo enviado para submissão na revista “International Archives of Otorhinolaryngology”

International Archives of Otorhinolaryngology (IAO)



Correlation of genetic ancestry with clinical and epidemiological features in oropharyngeal squamous-cell carcinoma : a preliminary study in Brazil

Journal:	<i>International Archives of Otorhinolaryngology (IAO)</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Research
Keyword:	HPV, Oropharyngeal Neoplasms, Head and Neck Neoplasms, Genetic Ancestry
Abstract:	<p>Background: Several factors play a role in patient susceptibility to a particular biological agent and genetic ancestry may affect patient susceptibility to certain infections such as HPV, an important etiologic factor for oropharyngeal squamous cell carcinoma. The aim of our study was to investigate the genetic ancestry in oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) patients.</p> <p>Methods: We conducted a cross-sectional study on patients with OPSCC admitted to the Barretos Cancer Hospital, Brazil from 2014 to 2019. Of these, DNA extraction was performed on 40 patients and genetic ancestry was assessed using a specific panel of 46 informative ancestry markers.</p> <p>Results: We observed a predominance of European ancestry (63%), followed by African (18%), Amerindian (9%) and Asian (8%), both in the OPSCC HPV-positive and HPV-negative group. We did not find any statistically significant differences between the HPV-positive and HPV-negative OPSCC groups in relation to European ($p = 0.499$), African ($p = 0.448$), Asian ($p = 0.275$) or Amerindian ($p = 0.836$) ancestry. We found that the African ancestral component is significantly associated with self-declared black patients and the European ancestral component was significantly associated with self-declared white patients.</p> <p>Conclusions: In our study, we found a predominance of European ancestry in both the OPSCCHPV-positive and HPV-negative groups and no statistically significant differences were found between HPV-positive or HPV-negative groups in relation to ancestry. A correlation was found between the African ancestral component with self-declared black patients and the European ancestral component with self-declared white patients</p>

<http://mc04.manuscriptcentral.com/iao-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

SCHOLARONE™
Manuscripts

<https://mc04.manuscriptcentral.com/iao-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Correlation of genetic ancestry with clinical and epidemiological features in oropharyngeal squamous-cell carcinoma : a preliminary study in Brazil

Chrystiano de C. Ferreira^{1,21*}, Ricardo R. Gama¹, Ana C. de Carvalho, PhD³, Iara Santana⁶, Raiany S. Carvalho¹, Debora S. de A. e Silva³, Lais M. de Jesus³, Rui M. Reis^{3,4,5}, Rozany Dufloth^{7,8}

¹Department of Head and Neck Surgery, Barretos Cancer Hospital, São Paulo, Brazil

²Department of Medicine, Federal University of Rondônia, Rondônia, Brazil

³Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, São Paulo, Brazil

⁴Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Medical School, University of Minho, Braga, Portugal

⁵ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

⁶Department of Pathology, Barretos Cancer Hospital, São Paulo, Brazil

⁷Institute of Anatomical Pathology, Rede D'Or São Luiz Hospitals Network, São Paulo, Brazil

⁸Department of Medicine, Centro Universitário São Camilo, São Paulo, Brazil.

Short Title: *genetic ancestry in oropharyngeal squamous-cell carcinoma*

Corresponding Author:

Chrystiano de Campos Ferreira

Department of Head and Neck surgery

Cancer Hospital of Barretos

1

<https://mc04.manuscriptcentral.com/iao-scielo>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

R. Antenor Duarte Viléla, 1331 - Dr. Paulo Prata Barretos Sao Paulo 14784-400 Brazil

City, State, Postal code, Country

E-mail: chrystiano_campos@yahoo.com.br

Keywords: HPV, genetic ancestry, Oropharyngeal Neoplasms, Head and Neck Neoplasms

For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 Abstract

2 Background:

3 Several factors play a role in patient susceptibility to a particular biological agent and genetic
4 ancestry may affect patient susceptibility to certain infections such as HPV, an important etiologic
5 factor for oropharyngeal squamous cell carcinoma. The aim of our study was to investigate the
6 genetic ancestry in oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC) patients.

7 Methods:

8 We conducted a cross-sectional study on patients with OPSCC admitted to the Barretos Cancer
9 Hospital, Brazil from 2014 to 2019. Of these, DNA extraction was performed on 40 patients and
10 genetic ancestry was assessed using a specific panel of 46 informative ancestry markers.

11 Results:

12 We observed a predominance of European ancestry (63%), followed by African (18%), Amerindian
13 (9%) and Asian (8%), both in the OPSCC HPV-positive and HPV-negative group. We did not find any
14 statistically significant differences between the HPV-positive and HPV-negative OPSCC groups in
15 relation to European ($p = 0.499$), African ($p = 0.448$), Asian ($p = 0.275$) or Amerindian ($p = 0.836$)
16 ancestry. We found that the African ancestral component is significantly associated with self-declared
17 black patients and the European ancestral component was significantly associated with self-declared
18 white patients.

19 Conclusions:

20 In our study, we found a predominance of European ancestry in both the OPSCC HPV-positive and
21 HPV-negative groups and no statistically significant differences were found between HPV-positive or
22 HPV-negative groups in relation to ancestry. A correlation was found between the African ancestral
23 component with self-declared black patients and the European ancestral component with self-
24 declared white patients

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

25 Introduction

26 Oropharyngeal cancer is one of the most common types of cancer in men.[1,2] According to INCA
27 (2019), the number of new cases of oral cancer expected for Brazil, for each year of the 2020-2022
28 triennium, will be 11,200 cases in men and 4,010 in women.[3] Nowadays, human papillomavirus
29 (HPV) infection represents an important etiologic factor for oropharyngeal squamous cell carcinoma
30 (OPSCC).[4] Human papilloma virus represents the most frequent viral sexually-transmitted
31 infection.[4]

32 Several factors can be related to a patient's susceptibility to a particular biological agent.[5] Thus,
33 different genetic ancestry could be related to different susceptibility to infections, including HPV and
34 this makes the correlation of OPSCC with the different genomic, clinical and epidemiological profiles
35 important.

36 The Brazilian population is very mixed in terms of ancestry. It is formed mainly by a mixture of
37 Europeans, Africans and Indigenous natives.[6] Due to this great miscegenation, the skin color and
38 self-declared ethnicity is often insufficient to classify or characterize an individual's ethnicity and
39 does not always correspond with their genomic ancestry.[7-9] In addition, each region of Brazil
40 experienced colonization from different nations and this is reflected in the ethnical differences of
41 these populations.[10] Recent studies have shown a weak correlation between skin color or self-
42 declared ethnicity with genetic ancestry determined by DNA markers.[11,12]

43 To determine the profile of genetic ancestry, the use of genetic informative ancestry markers
44 (AIMs) is described in the literature.[6,13] These ancestry markers are made up of insertion and
45 deletion polymorphisms (INDELs) where they show frequency differentials of marked alleles between
46 ancestral or geographically distant populations. These are especially useful for inferring the likely
47 ancestral origin of an individual or estimating the breakdown of ancestry components in individuals
48 or populations, namely European, African, Amerindian (indigenous) and Asian backgrounds.[13]

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

49 In this context, the aim of our study was to investigate the genetic ancestry in oropharyngeal
50 squamous cell carcinoma OPSCC patients. For that, we used the technique described by Pereira et
51 al,[13] using 46 informative ancestry markers (AIMs)Based on these markers, we estimated the
52 proportion that each patient has of each ancestry component (African, European, Asian and
53 Amerindian).

54 **Materials and Methods**

55 **Participants**

56 We performed a cross-sectional study from 2014 to 2019 with 40 patients diagnosed with OPSCC
57 treated at Barretos Cancer Hospital which is a tertiary referral institution for cancer treatment in
58 Brazil. Demographic data (sex, age, race/ethnicity, schooling) and clinical-pathological data (TNM
59 clinical stage according to the eighth edition of the American Joint Committee on Cancer (AJCC) TNM
60 staging system) were obtained from the medical records. In all patients, HPV status was determined
61 by p16 immunohistochemistry and DNA extraction was performed to characterize genetic
62 ancestry.The study was approved by the institutional ethics committee of Barretos Cancer Hospital,
63 number: 1.943.689 . Written informed consent wasobtained from each patient.

64 **HPV status**

65 The HPV status was determined by p16 immunohistochemistry, which is a well-established surrogate
66 marker to characterize HPV-positive oropharyngeal tumors.
67 Formalin-fixed, paraffin embedded primary-site tissue blocks were cut to 4µm sections. p16
68 Immunohistochemistry (IHC) was performed using the CINtec® p16 Histology kit (Roche MTM
69 Laboratories, Heidelberg, Germany), according to the manufacturer's instructions. The expression of
70 p16 was classified as positive in the presence of strong and diffuse staining in more than 75% of both
71 nuclei and cytoplasm. Any other color pattern was classified as negative. Thus, as reported, the
72 patients with p16 positivity by immunohistochemistry were considered to be HPV-positive.[14-16]

73 **DNA extraction**

1
2
3 74 The tumor DNA was extracted through surgical samples of paraffinized oropharyngeal tissues as
4
5 75 previously reported by our group.[17] The paraffin blocks of the selected patients were subjected to
6
7 76 4-5 cuts of 10µm to perform DNA isolation, using the Qiagen DNA Microkit, according to
8
9
10 77 manufacturers' specifications.

11 78 **Genetic Ancestry Determination**

12 79 After obtaining the DNA from the selected samples, the ancestry of the patients included in the study
13
14 80 was determined using a panel of 46 informative ancestry markers (AIMs), consisting of insertion and
15
16
17 81 deletion polymorphisms (INDELs), as previously described.[13,18]

18
19
20 82 Following multiplex PCR with 46 primers, the amplified products were subjected to capillary
21
22 83 electrophoresis and fragment analysis on an ABI 3500 Genetic Analyzer xL (Applied Biosystems),
23
24 84 according to the manufacturer's instructions. PCR conditions and primer sequences were performed
25
26
27 85 according to Pereira et al.[13,18] The ancestry proportion was obtained from the analysis with
28
29 86 GeneMapper v.4.1 (Life Technologies) and Structure v.2.3.4.13.

30
31
32 87 We considered the four main groups of natives that make up the Brazilian population (African,
33
34 88 European, Asian and Amerindian). Based on these 46 markers, we estimated the proportion that
35
36
37 89 each patient has of each ancestry component (African, European, Asian and Amerindian).

38
39 90 The sum of the proportions of all the ancestry components of a patient resulted in the number 1
40
41 91 (one) or 100%. We used the means and medians of the ancestry components of each patient to make
42
43 92 comparisons between groups. For example when we found in a table a reference to 0.67 of European
44
45 93 ancestry in HPV positive group in a table, this meant that the median of European ancestry of
46
47 94 patients in the HPV positive group was 0.67 or 67%.

48 95 **Data analysis**

49
50 96 All statistical analyses were performed using SPSS software version 21 (SPSS, Inc, Chicago, Illinois).

51
52 97 We correlated the mean and median of each component of genetic ancestry (European, African,

53
54 98 Asian and Amerindian) with each variable studied
55
56
57
58
59
60

99 To verify the relationships between the studied variables and genetic ancestry, we used Kruskal-
100 Wallis and Man-Whitney tests. A p-value < 0.05 was considered statistically significant.

101 Results

102 Patient's Clinical Characteristics

103 A total of 40 patients were included in the study. The clinic and pathologic variables are
104 summarized in Table 1. The majority were men (n=34, 85%), and the most frequent age group was >
105 50 years, (n=30, 75%). Most patients were illiterate (n=10, 25,0%) or have only completed primary
106 school education (n=13, 33,8%). Regarding race, the majority (n=25, 62.5%) self-declared as non-
107 white (brown, black, Asian, indigenous) and 15 (37.5%) of the patients self-declared as white. The
108 majority had advanced clinical stage (n=29, 71.8%). Regarding HPV status, 16(40%) were HPV-
109 positive and 24(60%) were HPV-negative.

110

111

Table 1—Clinical-pathological characteristics of oropharyngealsquamous cell carcinoma patients

Characteristic	n	(%)
Sex		
Male	34	85
Female	6	6.15
Age		
< 50 years	10	25
> 50 years	30	75
Self-declared race/ethnicity		
White	15	37.5
Other	25	62.5
Schooling		
Illiterate	10	25
Elementary school	13	33.8
High school	8	20.6
Higher	8	20.6
Clinical stage^a		
I e II - early	11	28.2
III e IV - advanced	29	71.8

60

7

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

P16 Status

Negative	24	60
Positive	16	40

112 ^aUICC 8th Edition.

113

Genetic Ancestry

114
115 The genetic ancestry was performed in all cases. In table 2, we observed the composition of ancestry
116 in the population studied, where we obtained a predominance of European ancestry, with the
117 following averages of ancestry proportions: European 0.63, African 0.18, Asian 0.08 and Amerindian
118 0.09. (Table 2)

119

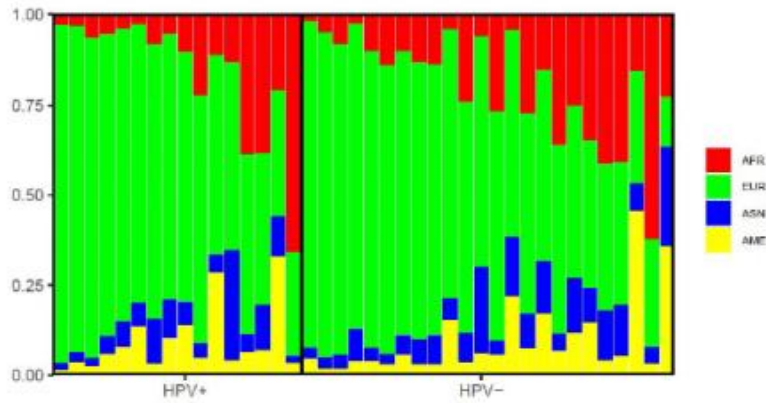
Table 2 - Composition of genetic Ancestry in the studied patients

Ancestry	N	Mean	Median
African	40	0.18(0.16)	0.13(0.02-0.66)
European	40	0.63(0.21)	0.66(0.14-0.94)
Asian	40	0.08(0.07)	0.07(0.02-0.31)
Amerindian	40	0.09(0.10)	0.06(0.0-0.46)

120

121 We compared the composition of the ancestry markers in the HPV-positive and HPV-negative groups
122 and observed a predominance of proportion of European ancestry in both groups. Each vertical bar
123 represents a case and the numbers (0.25, 0.50, 0.75 e 1.00) corresponds to a percentage of each
124 ancestral proportion (Fig. 1).

125



126

127

128 **Figure 1 - Graphical representation of the estimated ancestry of HPV-positive and HPV-negative**
 129 **groups from the genotyping data of the 46 AImS panel. Each vertical bar represents a case. The**
 130 **ancestral proportion (percentage) is represented in colors: Red - African; Green - European; Blue -**
 131 **Asian; Yellow - Amerindian.**

132

133

134 In order to correlate the role of each distinct ethnicity in the epidemiological and pathological profile,

135 we independently analyzed the markers of the 4 ethnic groups and associated them with some

136 variables.

137 We observed that African ancestry is associated with self-declared black patients ($p = 0.040$) (Table

138 3). We did not find any association with sex, age, schooling, skin colour, clinical stage or HPV status

139 The European ancestry was significantly associated with self-declared white patients ($p = 0.005$)

140 (Table 4) and no association with the sex, age, schooling, skin colour, clinical stage or HPV status was

141 found in this group either.

142 We did not find any correlation between Asian and Amerindian ancestry and the variables studied

143 (Table 5-6).

144

145

60

9

1
2
3 146
4
5 147
6
7

Table 3- Association between African ancestry and clinical-pathological variables

		African Ancestry			
		N	Mean	Median	P-value
Sex ^a	Male	34	0.17	0.13(0.02-0.62)	0.820
	Female	6	0.24	0.16(0.03-0.66)	
Age ^b	<50	10	0.2	0.11(0.04-0.62)	0.803
	>50	30	0.22	0.14(0.03-0.66)	
Schooling ^b	Illiterate	10	0.19	0.182(0.03-0.62)	0.904
	Elementary school	13	0.19	0.13(0.04-0.66)	
	High school	8	0.16	0.104(0.02-0.40)	
Skin colour ^b	Higher	8	0.2	0.19(0.03-0.39)	0.040*
	White	15	0.13(0.12)	0.07(0.02-0.41)	
	Brown	20	0.18(0.12)	0.14(0.03-0.41)	
	Black	4	0.44(0.23)	0.44(0.23-0.66)	
	Asian	1	0.13	0.13(0.13-0.13)	
Clinical Stage ^a	Indigenous	0	-	-	0.778
	Early (I / II)	11	0.16	0.13(0.03-0.38)	
	Advanced (III / IV)	29	0.2	0.14(0.02-0.66)	
HPV ^a	Negative	24	0.19(0.15)	0.14(0.02-0.62)	0.448
	Positive	16	0.17(0.17)	0.10(0.03-0.66)	

(a) Analysis by Mann-Whitney test. (b) Analysis by Kruskal-Wallis test.

* Statistically significant difference $p < 0.05$

36
37
38 148
39
40 149
41
42
43 150
44

Table 4- Association between European ancestry and clinical-pathological variables

		European Ancestry			
		N	Mean	Median	P-value
Sex ^a	Male	34	0.62	0.64(0.14-0.90)	0.677
	Female	6	0.67	0.73(0.29-0.94)	
Age ^b	<50	10	0.60	0.60(0.30-0.90)	0.887
	>50	30	0.66	0.69(0.35-0.94)	
Schooling ^b	Illiterate	10	0.58	0.63(0.13-0.84)	0.710
	Elementary school	13	0.64	0.73(0.28-0.86)	

56
57
58
59
60

10

	High school	8	0.67	0.65(0.39-0.90)	
	Higher	8	0.69	0.69(0.42-0.94)	
Skin colour ^b	White	15	0.75	0.79(0.41-0.94)	0.005*
	Brown	20	0.6	0.60(0.31-0.86)	
	Black	4	0.34	0.29(0.14-0.86)	
	Asian	1	0.52	0.52(0.52-0.52)	
	Indigenous	0	-	-	
Clinical Stage ^a	Early (I / II)	11	0.66	0.68(0.42-0.94)	0.779
	Advanced (III / IV)	29	0.62	0.64(0.14-0.90)	
HPV ^a	Negative	24	0.61	0.64(0.14-0.90)	0.499
	Positive	16	0.67	0.71(0.29-0.94)	

(a) Analysis by Mann-Whitney test. (b) Analysis by Kruskal-Wallis test

* Statistically significant difference $p < 0.05$

151

152

Table 5- Association between Asian Ancestry and clinical-pathological variables

		Asian Ancestry			P-value
		N	Mean	Median	
Sex ^a	Male	34	0.10	0.08(0.02-0.31)	0.092
	Female	6	0.05	0.06(0.02-0.07)	
Age ^b	<50	10	0.11	0.08(0.03-0.31)	0.232
	>50	30	0.08	0.07(0.02-0.15)	
Schooling ^b	Illiterate	10	0.10	0.08(0.04-0.27)	0.427
	Elementary school	13	0.09	0.07(0.02-0.24)	
	High school	8	0.10	0.05(0.03-0.31)	
	Higher	8	0.06	0.05(0.02-0.15)	
Skin colour ^b	White	15	0.07	0.06(0.02-0.15)	0.137
	Brown	20	0.09	0.08(0.04-0.24)	
	Black	4	0.09	0.04(0.02-0.27)	
	Asian	1	0.31	0.31(0.31-0.31)	
	Indigenous	0	-	-	
Clinical Stage ^a	Early (I / II)	11	0.10	0.06(0.02-0.31)	0.708
	Advanced (III / IV)	29	0.09	0.07(0.02-0.27)	
HPV ^a	Negative	24	0.09	0.08(0.03-0.27)	0.275

11

1
2
3
4
5
6
7
8 153
9
10 154
11
12 155
13
14 156
15
16 157
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54 158
55
56 159
57
58
59
60

	Positive	16	0.08	0.06(0.02-0.31)
--	----------	----	------	-----------------

(a) Analysis by Mann-Whitney test. (b) Analysis by Kruskal-Wallis test

* Statistically significant difference $p < \text{or} = 0.05$

Table 6- Association between Amerindian Ancestry and clinical-pathological variables

		Amerindian Ancestry			P-value
		N	Mean	Median	
Sex ^a	Male	34	0.10	0.05(0.02-0.46)	0.495
	Female	6	0.07	0.06(0.00-0.14)	
Age ^b	<50	10	0.08	0.05(0.02-0.22)	0.038
	>50	30	0.09	0.05(0.00-0.33)	
Schooling ^b	Illiterate	10	0.12	0.09(0.03-0.36)	0.56
	Elementary school	13	0.08	0.06(0.02-0.33)	
	High school	8	0.07	0.04(0.02-0.28)	
	Higher	8	0.06	0.04(0.00-0.17)	
Skin colour ^b	White	15	0.06	0.04(0.01-0.17)	0.465
	Brown	20	0.12	0.07(0.00-0.46)	
	Black	4	0.12	0.04(0.03-0.36)	
	Asian	1	0.04	0.04(0.04-0.04)	
	Indigenous	0	-	-	
Clinical Stage ^a	Early (I / II)	11	0.10	0.10(0.01-0.28)	0.296
	Advanced (III / IV)	29	0.09	0.05(0.00-0.46)	
HPV ^a	Negative	24	0.10	0.06(0.02-0.46)	0.836
	Positive	16	0.09	0.05(0.00-0.33)	

(a) Analysis by Mann-Whitney test. (b) Analysis by Kruskal-Wallis test

* Statistically significant difference $p < \text{or} = 0.05$

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

160
161
162
163
164
165

166 Discussion

167 Head and neck cancer is a major public health problem. According to GLOBOCAN 2018 [1] oral cancer
168 is the 8th most common cancer in the world, representing 2% (354,864) of the total number of new
169 cancer cases.

170 In the USA, tumors of the mouth and pharynx occupy the eighth position as the most common cause
171 of cancer. Estimates for 2019 point to 53,000 new cases of oral cavity and pharynx cancer diagnosed
172 each year, with 38,140 new cases for men and 14,860 new cases for women. [2]

173 Our study aims to characterize the genetic ancestry of a series of 40 OPSCC patients treated at the
174 Barretos Cancer Hospital and to correlate this with the different clinical-pathological factors.

175 The population in our study was predominantly male (85%) with the majority (75%) > 50 years old.

176 Most (71.8%) patients were in advanced stage III or IV and with low education levels. These data are
177 in accordance with the epidemiology of the OPSCC reported in the world literature. [2,5,15]

178 Our study showed a prevalence of HPV positivity in oropharyngeal carcinomas of 40%. Most studies
179 involving populations in developing countries have low incidence of HPV in oropharyngeal tumors.
180 [1-3]

181 One of the differentials of our study is that we determined the percentages of African, European,
182 Amerindian and Asian ancestry for patients with OPSCC, using the AIMs panel (Ancestry-informative
183 Markers). This paper is the first study that researched genetic ancestry from DNA in OPSCC.

184 In this study we found a predominance of European ancestry, both in (OPSCC)HPV-positive and HPV-
185 negative patients. We also found that African ancestry was significantly associated with self-reported
186 black colour and European ancestry for self-reported white patients.

1
2
3 187 We chose to identify the hyperexpression of the p16 protein as a substitute marker for HPV, due to
4
5 188 the low cost and high correlation with HPV positivity, as has been widely reported in several
6
7 189 studies.[19-21]
8
9
10 190 The Brazilian population has a broad genetic heterogeneity, mainly due to the miscegenation of the
11
12 191 native populations of the Americas (Amerindians), the colonizing populations (Europeans) and the
13
14 192 slaves brought from Africa (Africans).[12,22]
15
16 193 We found a predominance of the European component (63%) followed by African (18%), and a
17
18 194 balance between the proportions of the Amerindian (9%) and Asian (8%) components.
19
20
21 195 This predominance of the European component in the ancestry of Brazilians has been evidenced by
22
23 196 several studies.[12,22-25]In the study by Leite et.al. [12] 172 patients showed 69% European
24
25 197 ancestry, 21% African ancestry and 10% Amerindian ancestry, respectively. In another study[24] with
26
27 198 934 patients from various regions of Brazil, Leite et al. identified European ancestry ranging from
28
29 199 60.6% to 77.7%, African from 10.9% to 30.3% and Amerindian from 7.4% to 19.4%.Another study by
30
31 200 Lins et al [13], conducted on 189 women, found that European ranged from 69.5% to 87.7%, African
32
33 201 from 7% to 18.7% and Amerindian from 5.2% to 11.8%, respectively.
34
35
36 202 These data show the strong European influence on the genetic composition of the Brazilian
37
38 203 population.
39
40
41 204 When we analyzed the components of ancestry separately, we found that the African ancestral
42
43 205 component is significantly associated with self-declared black patients ($P=0.040$).
44
45 206 The European ancestral component was significantly associated with self-declared white patients ($P =$
46
47 207 0.005).No correlation was found between Asian and Amerindian ancestry with skin colour.
48
49
50 208 The study by Leite et al [12] analyzed 172 Brazilian patients whose self-declared colour correlated
51
52 209 with the amount of melanin and the genomic ancestry pattern based on 21 AIM. They observed a
53
54 210 low relationship between the self-declared colour and the ancestral profile. Patients who self-
55
56 211 reported as white had 72% European ancestry, followed by 19% African and 9% Amerindian.
57
58
59
60

1
2
3 212 Participants who declared themselves brown had 68% European ancestry followed by 21% African
4
5 213 and 11% Amerindian, respectively. In contrast, the self-declared black patient group had 63%
6
7 214 European ancestry, 27% African and 10% Amerindian, respectively.
8
9 215 The study of Lins et. al. [22] analyzed 189 women in the climacteric period and also compared the
10
11 216 self-declared color with genomic ancestry based on 13 AIM. He also found a low correlation between
12
13 217 the self-declared color and the ancestral profile. Lins et. al. found 73.8% European ancestry in
14
15 218 individuals who declared themselves to be white, followed by 17.2% African and 9% Amerindian.
16
17 219 Participants who declared themselves brown had 61.5% European ancestry followed by 25.6%
18
19 220 African and 14.1% Amerindian, while in patients who self-declared as black, had 62.9% European
20
21 221 ancestry, 25.4% African and 11.7% Amerindian.
22
23 222 We did not find a correlation between genetic ancestry and clinical staging. The studies found in the
24
25 223 literature are controversial, but most studies show that blacks have a tendency to have more
26
27 224 advanced clinical stages than white. (27-29) Black patients also have a tendency to have advanced T
28
29 225 and advanced N compared to white patients. [29,30]
30
31
32
33
34
35 226
36
37 227 We found no statistical relationship between HPV status and African ($p=0.448$), European ($p=0.448$)
38
39 228 Asian ($p=0.275$) or Amerindian ($p=0.836$) genetic ancestry
40
41 229 We found no studies that compared genetic ancestry with HPV status. We did find, however, a
42
43 230 correlation between self-declared white ethnicity and HPV positivity described in the literature as in
44
45 231 the study by Settle et al. [26]. In this study, a higher prevalence of HPV (+) in white patients was found.
46
47 232 A possible explanation for not finding a correlation in our study is due to the great miscegenation of
48
49 233 the Brazilian population.
50
51 234 No correlation was found between African, European, Asian or Amerindian ancestry and sex, age,
52
53 235 schooling, skin colour or clinical stage.
54
55 236 The sample size of our study was relatively small. In the future, a large study should be conducted to
56
57 237 understand better the relation of ancestry and the OPSCC
58
59
60

1
2
3 238 This study contributes to the understanding the role of genetic ancestry in OPSCC.OPSCC. While
4
5 239 previous studies have focused specifically on self-declared skin color, our study demonstrates that it
6
7
8 240 is possible to analyze the profile of genetic ancestry through ancestry markers.
9

10 241

11 242 **Conclusion**

12 243 Our preliminary findings demonstrated a predominance of European ancestry, followed by African
13
14 244 ancestry and a balance between the proportions of the Asian and Amerindian components in both
15
16 245 the HPV-positive and HPV-negative OPSCC groups. In our study we did not find any statistically
17
18 246 significant differences between HPV-positive or HPV-negative groups in relation to ancestry.
19
20 247 We found a correlation between the African ancestral component with self-declared black patients
21
22 248 and the European ancestral component with self-declared white patients.
23
24 249 Understanding these of these ancestry markers may be used in future studies to better understand
25
26 250 the relationship between genetic ancestry, head and neck and HPV tumors.
27
28
29
30
31

32 251

33 252

34 253

35 254

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

255 **Acknowledgement**

256 We thank the Barretos Cancer Hospital and the Nucleus of Epidemiology and Statistics of Barretos
257 Cancer Hospital for support in statistical analysis.

258 **Statement of Ethics**

259 The study was approved by the institutional ethics committee of Barretos Cancer Hospital, number:
260 1.943.689 . Written informed consent was obtained from each patient.

261

262 **Conflict of Interest Statement**

263 The authors have no conflicts of interest to declare.

264 **Funding Sources**

265 The authors report no funding sources.

266 **Author Contributions**

267

268 Chrystiano de C. Ferreira and Rozany Dufloth conceived and designed the study, collected the data,
269 wrote, edited the manuscript. Debora S. de A. e Silva, Laís M. de Jesus, Ana C. de Carvalho and Rui M.
270 Reis determined the genetic ancestry of the patients. Raiany S. Carvalho collected the data. Iara
271 Santana determined the HPV status was by p16 immunohistochemistry. Ricardo R. Gama, Rui M. Reis
272 and Rozany Dufloth reviewed the manuscript.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

References

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68:394-424.
2. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 2019;69:7-34.
3. INCA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Jose Alencar Gomes da Silva instituto nacional do câncer. Rio de Janeiro, RJ: INCA; 2019.
4. Biologicalagents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum 2012;100:1-441.
5. Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2014;50:380-386.
6. Souza AM, Resende SS, Sousa TN, Brito CFA. A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genet Mol Biol* 2019;42:495-508.
7. Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, et al. Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:8696-8701.
8. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, et al. Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative). *Sci Rep* 2015;5:9812.
9. Risch N, Choudhry S, Via M, et al. Ancestry-related assortative mating in Latino populations. *Genome Biol* 2009;10:R132.
10. Manta FS, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmão L, Carvalho EF. Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol* 2013;40:94-98.
11. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, et al. Genetic heterogeneity of self-reported ancestry groups in an admixed Brazilian population. *J Epidemiol* 2011;21:240-245.
12. Leite TK, Fonseca RM, de França NM, Parra EJ, Pereira RW. Genomic ancestry, self-reported "color" and quantitative measures of skin pigmentation in Brazilian admixed siblings. *PLoS One* 2011;6:e27162.
13. Pereira R, Phillips C, Pinto N, et al. Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One* 2012;7:e29684.
14. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol* 2012;36:945-954.
15. Larsen CG, Gyldenlove M, Jensen DH, et al. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer* 2014;110:1587-1594.

18

16. Possati-Resende JC, Fregnani JH, Kerr LM, Mauad EC, Longatto-Filho A, Scapulatempo-Neto C. The accuracy of p16/Ki-67 and HPV test in the detection of CIN2/3 in women diagnosed with ASC-US or LSIL. *PLoSOne* 2015;10:e0134445.
17. Arantes L, Cruvinel-Carloni A, de Carvalho AC, et al. TERT Promoter Mutation C228T Increases Risk for Tumor Recurrence and Death in Head and Neck Cancer Patients. *Front Oncol* 2020;10:1275.
18. Durães RO, Berardinelli GN, da Costa AM, et al. Role of Genetic Ancestry in 1,002 Brazilian Colorectal Cancer Patients From Barretos Cancer Hospital. *Front Oncol* 2020;10:145.
19. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009;27:1992-1998.
20. Fakhry C, Lacchetti C, Rooper LM, et al. Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: ASCO clinical practice guideline endorsement of the college of American pathologists guideline. *J Clin Oncol* 2018;36:3152-3161.
21. Hsieh JC, Wang HM, Wu MH, et al. Review of emerging biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma in the era of immunotherapy and targeted therapy. *Head Neck* 2019;41 Suppl 1:19-45.
22. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs. *Am J Hum Biol* 2010;22:187-192.
23. Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, et al. Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. *Hum Hered* 2006;62:190-195.
24. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoSOne* 2011;6:e17063.
25. Fernandes GC, Michelli RA, Galvão HC, et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget* 2016;7:80465-80481.
26. Settle K, Posner MR, Schumaker LM, et al. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. *Cancer Prev Res (Phila)* 2009;2:776-781.
27. Yu AJ, Choi JS, Swanson MS, et al. Association of Race/Ethnicity, Stage, and Survival in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A SEER Study. *OTO Open* 2019;3:2473974x19891126.
28. Gourin CG, Podolsky RH. Racial disparities in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2006;116:1093-1106.
29. Nichols AC, Bhattacharyya N. Racial differences in stage and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2007;117:770-775.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

30. Liu SZ, Zandberg DP, Schumaker LM, Papadimitriou JC, Cullen KJ. Correlation of p16 expression and HPV type with survival in oropharyngeal squamous cell cancer. *Oral Oncol* 2015;51:862-869.

For Review Only