

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

Deteção Precoce de Neoplasias Malignas da Cabeça e do Pescoço - Induzidas por HPV - através da Saliva

Early Detection of Head and Neck Cancer – HPV Induced - through Saliva

Ana Teresa Carneiro Teixeira

M

2023



Artigo de revisão bibliográfica submetido à Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto para obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária.

Área científica: Medicina Oral

Autora: Ana Teresa Carneiro Teixeira¹

Orientador: Professor Doutor Filipe Poças de Almeida Coimbra²

Coorientador: Professor Doutor Pedro de Sousa Gomes³

1. Estudante do 5º ano do Mestrado Integrado em Medicina Dentária; Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto; Número de estudante: 201706467; Endereço eletrónico: anateresa_txx@hotmail.com / up201706467@up.pt
2. Professor Auxiliar com Agregação da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto
3. Professor Catedrático da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Porto, 2023

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador e coorientador, à minha família, amigos e a todos os que me acompanharam nesta jornada, obrigada!

*“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”*

Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

Introdução: A infecção por HPV constitui um fator de risco etiológico no desenvolvimento de neoplasias da cabeça e do pescoço. A detecção de genótipos de HPV relacionados com risco de neoplasia da cabeça e pescoço, através de biomarcadores salivares, tem sido uma área promissora na detecção destas neoplasias. Tem contribuído assim para um melhor prognóstico destes pacientes, que na maior parte das vezes, quando diagnosticados, já se encontram numa fase avançada em que o dano é irreversível e o tratamento ineficiente.

Objetivos: Esta revisão bibliográfica visa reunir a informação atual, avaliar possíveis biomarcadores salivares e estimar o impacto da sua testagem no diagnóstico precoce de neoplasias malignas da cabeça e do pescoço associadas a HPV, e consequentemente, estimar a sua viabilidade na prática clínica de medicina dentária em pacientes de risco.

Material e métodos: A pesquisa de literatura foi realizada com recurso às plataformas *online Pubmed, Scopus e Web of Science*. Foram utilizados como critérios de inclusão artigos publicados nos últimos 10 anos, escritos em língua portuguesa, inglesa e espanhola. Artigos cujo tema não iam de encontro ao tema da monografia, ou considerados pouco relevantes foram excluídos. Em suma, foram incluídos 43 artigos para a elaboração desta revisão bibliográfica.

Desenvolvimento: O carcinoma de células escamosas é o tipo de cancro mais comum na região da cabeça e do pescoço, e a detecção precoce do tumor primário constitui um fator chave para o aumento da taxa de sobrevivência destes doentes.

A infecção por HPV é um dos fatores de risco associados ao desenvolvimento de neoplasias malignas da cabeça e do pescoço, nomeadamente a presença dos tipos oncogénicos mais prevalentes – HPV tipo 16, 18 e 33. Apesar de apresentar um bom prognóstico, na maior parte dos casos, o seu diagnóstico tardio associado à localização de difícil acesso, pioram a esperança média de vida destes doentes.

Desta forma, a análise de biomarcadores como ADN de HPV, p16, oncoproteínas E6 e E7, entre outros, em amostras salivares, permite a detecção de indícios ou predisposição para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas, de forma menos invasiva e acessível.

A aplicação deste método na prática clínica de medicina dentária possibilita um maior controlo e monitorização da neoplasia, e em última instância, que o médico dentista adquira um papel crucial na melhoria do prognóstico destes doentes.

Conclusão: A testagem salivar constitui um método viável que permite avaliar quer a predisposição para o desenvolvimento da patologia, quer o diagnóstico, monitorização da doença e resposta à terapia. A integração da testagem salivar ao nível da prática clínica em pacientes de risco apresenta uma relação custo-benefício favorável, no entanto é necessário um maior número de ensaios clínicos para uma melhor caracterização de candidatos a biomarcadores circulantes. Efetivamente, apesar da variedade de testes disponíveis e de novas técnicas não-invasivas, não há consenso sobre qual a melhor técnica a empregar. Relativamente aos biomarcadores utilizados, está comprovado que os métodos baseados na deteção de ADN de HPV são mais fiáveis quando comparados com a utilização de RNA.

Palavras-chave: HPV, Head and Neck Cancer, Saliva, Biomarkers, Testing

ABSTRACT

Introduction: HPV infection is an etiological risk factor in the development of head and neck cancer. The early detection of HPV-related genotypes associated with head and neck cancer through salivary biomarkers has been a promising area in the early detection of these cancers, contributing to a better prognosis for these patients. Most of the time, when diagnosed, they are already in an advanced stage where the damage is irreversible, and treatment is inefficient.

Objectives: This literature review aims to gather current information, evaluate potential salivary biomarkers, and estimate the impact of their testing on the early diagnosis of HPV-associated malignant head and neck cancer. Consequently, it aims to estimate their feasibility in the clinical practice of dental medicine in high-risk patients.

Materials and methods: The literature search was conducted using the online platforms Pubmed, Scopus, and Web of Science. Articles published in the last 10 years, written in Portuguese, English, and Spanish, were included as criteria. Articles that did not align with the topic of the thesis or were considered irrelevant were excluded. In summary, 43 articles were included in the development of this literature review.

Development: Squamous cell carcinoma is the most common type of cancer in the head and neck region, and early detection of the primary tumor is a key factor in increasing the survival rate of these patients.

HPV infection is one of the risk factors associated with the development of malignant head and neck cancer, particularly the presence of oncogenic types - HPV types 16, 18, and 33. Despite having a good prognosis, late diagnosis and difficult-to-access locations worsen the average life expectancy of these patients.

Therefore, the analysis of biomarkers such as HPV DNA, p16 and oncoproteins E6 and E7, among others, in salivary samples allows the detection of signs or predisposition to the development of squamous cell carcinoma in a less invasive and accessible manner.

The application of this method in the clinical practice of dental medicine enables greater control and monitoring of the neoplasm and, ultimately, improves patient's prognosis.

Conclusion: Salivary testing is a viable method that allows the evaluation of both predisposition to the development of the pathology and diagnosis, monitoring of the disease, and response to therapy. The integration of salivary testing in the clinical practice of high-risk patients presents a favorable cost-benefit relationship. However, further clinical trials are needed for a better characterization of circulating biomarker candidates. Despite the variety of available tests and new non-invasive techniques, there is no consensus on the best technique to apply. Regarding the biomarkers used, it has been proven that methods based on HPV DNA detection are more reliable compared to those using RNA.

Keywords: HPV, Head and Neck Cancer, Saliva, Biomarkers, Testing

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

CCECP – Carcinoma de Células Escamosas da Cabeça e do Pescoço

CCEO – Carcinoma de Células Escamosas da Orofaringe

cfDNA – ADN Livre de Células

CNA – *Copy Number Aberrations*

CNI – *Copy Number Instability*

CTCs – Células Tumorais Circulantes

FDA – *Food and Drug Administration*

HIV – Vírus da Imunodeficiência humana

HPV – Vírus do Papiloma Humano

HPV + - Vírus do Papiloma humano presente

HPV - - Vírus do papiloma humano ausente

miRNA – Micro Ácido Ribonucleico

mRNA – Ácido Ribonucleico Mensageiro

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

pRb – Proteína do Retinoblastoma

TAC – Tomografia Computorizada

TNM - *Tumor, Node, Metastasis*

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	ix
ÍNDICE	x
ÍNDICE DE TABELAS	xi
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAIS E MÉTODOS	5
DESENVOLVIMENTO.....	6
Neoplasias malignas da cabeça e do pescoço e a sua relação com o HPV	6
Diagnóstico.....	9
1. Biópsia Líquida vs Biópsia Tecidular	10
2. Biomarcadores Salivares	11
3. Testes comercializados	14
Estadiamento de CCEO HPV+.....	16
Papel do Médico Dentista e Incorporação da Testagem em Ambiente Clínico.....	19
DISCUSSÃO	21
CONCLUSÃO	23
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	24
ANEXOS	27

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Fluxograma do processo de busca e seleção de artigos

Tabela 2 – Testes salivares disponíveis para a detecção de CCEO HPV+, respetivo método de detecção, sensibilidade e especificidade

Tabela 3 - Estadiamento de CCEO HPV+ segundo a 8ª edição da AJCC (2017)

INTRODUÇÃO

O vírus do papiloma humano (HPV) engloba uma família de vírus de ADN de cadeia dupla, sem envelope, com mais de 220 tipos identificados, e que pode infectar as células basais do epitélio da pele ou mucosa.⁽¹⁻³⁾ O seu genoma de forma circular apresenta cerca de 8000 pares de bases que codificam dois genes estruturais (L1 e L2), e seis genes não estruturais, responsáveis pela transmissão viral, com especial destaque para E5, E6 e E7, com potencial de transformação celular.⁽⁴⁾ De acordo com o esquema representado, o genoma de HPV está dividido em 3 regiões distintas, região E, composta por genes que codificam para uma função viral precoce (E1-E7), região L, com genes que codificam para uma função viral tardia (L1 e L2), e a região de controlo de locus (LCR) não codificante.⁽⁵⁾

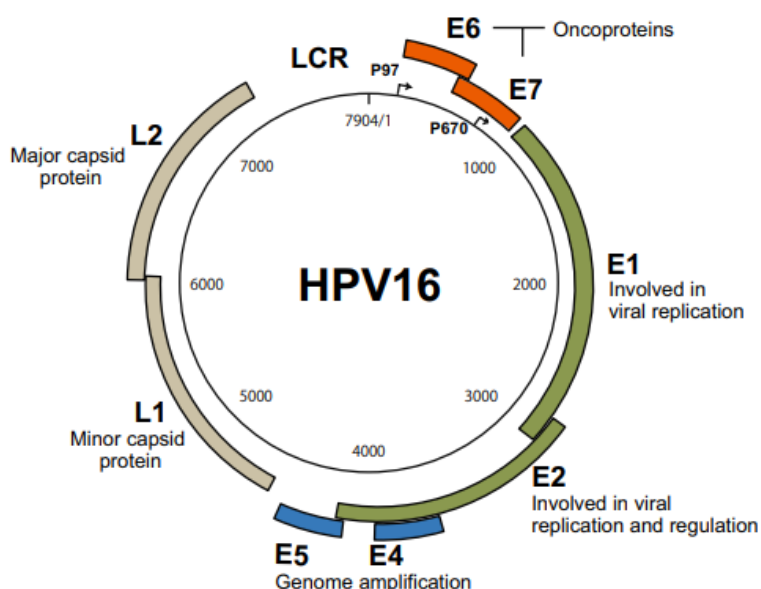


FIGURA 1: Esquema representativo do genoma circular de HPV tipo 16 e a respetiva função dos genes virais.⁽⁵⁾

A transmissão de HPV ocorre principalmente através da prática de relações sexuais, nomeadamente, sexo oral e contacto entre a região da cavidade oral e a região genital, ou partilha de fluidos entre cavidades orais.⁽⁶⁾ Na verdade, a infeção por HPV constitui a infeção sexualmente transmissível mais comum em todo o mundo.⁽¹⁾ Num panorama global, estima-se que mais 630 milhões de pessoas estejam infetadas com HPV.⁽¹⁾

Na maior parte dos casos, a sua apresentação é assintomática e regride espontaneamente pós-infecção. Caso estejam presentes, as manifestações clínicas surgem sob a forma de tumores benignos ao nível da pele (*Verruca Vulgaris*) e mucosa, incluindo a cavidade oral, e a zona genital (*Condyloma Acuminata*). Estes casos estão geralmente associados aos tipos de HPV de baixo risco, também denominados não oncogénicos, como os HPV tipo 6 e 11⁽¹⁾.

Embora a maior parte das infeções regrida espontaneamente, o tipo de HPV 16, também conhecido como HPV de alto risco ou oncogénico, associado ao desenvolvimento de carcinoma de células escamosas da orofaringe (CCEO), apresenta a taxa de *clearance* mais baixa comparativamente aos restantes tipos de HPV. Quer isto dizer que na maior parte dos casos, esta persistência traduz-se numa infeção que poderá permanecer latente entre 10 a 30 anos até ao desenvolvimento eventual de um carcinoma.⁽¹⁾ Note-se que, cerca de 90% dos casos de CCEO HPV+, nomeadamente na região cervical e orofaríngea, são HPV do tipo 16 (seguido pelos tipos 33, 35 e 18) e a prevalência é maior em indivíduos do sexo masculino, e em países desenvolvidos, potencialmente sugerindo a existência de outros fatores de risco.^{(7, 8) (9, 10)}

Juntamente com o consumo de álcool e tabaco, que apresentam efeitos sinérgicos, a infeção por HPV é um fator de risco etiológico no que toca ao desenvolvimento de neoplasias da cabeça e do pescoço, que constituem o sexto tipo de cancro mais comum em todo o mundo, com mais de 300.000 mortes anualmente.⁽¹¹⁾

Enquanto a prevalência de neoplasias da cabeça e do pescoço HPV negativas (isto é, não associadas à infeção por HPV) sofreu um declínio, consistente com a diminuição do consumo de tabaco, a deteção de neoplasias HPV positivas, tem vindo a aumentar nos últimos anos.⁽¹²⁾ Efetivamente, mais de 70% dos cancros orofaríngeos apresentam como etiologia a infeção por HPV.⁽¹³⁾ Contudo, a existência de biomarcadores, destinados à deteção, prognóstico e monitorização da doença são escassos tendo sido esta a oportunidade da comunidade científica explorar novos métodos de diagnóstico e monitorização.^(11, 14)

A busca por uma alternativa tem como objetivo colmatar a maioria dos diagnósticos tardios, realizados através de biópsias tecidulares ou citologia aspirativa, necessariamente na presença de manifestações clínicas, e por isso

frequentemente indicativos de um estágio avançado da doença. É um procedimento que além de causar grande desconforto ao doente, implica maior custo monetário. Note-se que, no caso de neoplasias malignas orofaríngeas, a sua detecção é comprometida pela localização de difícil acesso. Adicionalmente, estudos alertam para a elevada capacidade deste tipo de neoplasias disseminar e metastizar para gânglios linfáticos em fases iniciais, mesmo sem apresentação clínica detetável.⁽¹⁴⁾ Efetivamente, apesar dos avanços no tratamento deste tipo de neoplasias nas últimas décadas, a taxa de sobrevivência apresentou um aumento irrisório, em parte devido ao curso avançado da patologia aquando do diagnóstico, e a elevada taxa de insucesso de tratamento associada ao diagnóstico tardio.⁽²⁾

Por conseguinte, a existência de técnicas biológicas moleculares como meio de diagnóstico, permitiram a sua detecção precoce, previsibilidade da resposta à terapia, seleção de terapia guiada e monitorização eficaz da doença, tudo isto a fim de melhorar a qualidade de vida do doente.⁽²⁾ A biópsia líquida, caracterizada pela análise de fluídos biológicos com potencial valor diagnóstico e prognóstico, podem permitir a detecção de células tumorais circulantes (CTCs) e células circulantes livres de ADN tumoral (cfDNA), que são libertadas na corrente sanguínea por células cancerígenas em apoptose, autofagia ou necrose.^(2, 15) Comparativamente às biópsias tecidulares, a utilização de biomarcadores detetados na saliva ou no plasma, constituem um método menos invasivo, mais acessível, com relação custo-benefício favorável na monitorização das características moleculares da neoplasia, permitindo a recolha e análise de múltiplas amostras.⁽¹⁶⁾ Para este efeito, alguns dos indicadores analisados na literatura são a presença de oncoproteínas (E6, E7 e L1) unicamente expressas por HPV^(9, 13, 17), expressão de ADN de HPV, expressão de p16, microRNA e mRNA.^(10, 14) Os métodos de testagem consistem na detecção de HPV e, por vezes, quantificação, através da análise molecular baseada em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), devido à elevada sensibilidade e especificidade na detecção de várias características identificativas do vírus, em simultâneo.

A integração da testagem não invasiva em ambiente clínico surgiu, não só pela necessidade, mas também devido à disponibilidade de testes que poderão ser facilmente incorporados no fluxo conjugado de atividade clínica e trabalho laboratorial. A literatura referente à testagem de HPV é extensa e inclusive existem já métodos de testagem aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e

Comissão Europeia. ⁽¹⁸⁾ Importa salientar a importância da criação de recomendações, que abranjam a sua aplicação, os grupos de pacientes de maior risco, e a correta seleção de biomarcadores específicos e robustos que forneçam informação fidedigna e conclusiva. Como supracitado, além da possibilidade de diagnóstico atempado, há uma infinidade de aplicações, sendo uma delas o desenvolvimento de uma relação conjunta com o médico oncologista e o clínico da cabeça e do pescoço, através da monitorização da patologia, quer durante o seu curso e controlo da resposta à terapia, quer após a resolução - casos de recidiva.

Apesar da vacinação profilática ter melhorado o panorama da infeção, atualmente as estatísticas permanecem ainda pouco animadoras e, por isso, a necessidade de desenvolver métodos eficazes e acessíveis para o controlo de infeção continua a ser um objetivo em curso, no contexto destas patologias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Realizou-se a pesquisa entre setembro 2022 e janeiro de 2023, recorrendo às bases de dados *online PubMed*, *Scopus* e *Web of Science*, tendo sido utilizados os seguintes termos como palavras-chave: “HPV”, “*head and neck cancer*”, “*saliva*”, “*biomarkers*” e “*testing*”. O marcador booleano “AND” foi usado para conjugar as palavras-chave entre si.

Foram excluídos os artigos publicados em línguas que não o inglês, português ou espanhol, e artigos publicados há mais de 10 anos. Foram então selecionadas todas as revisões sistemáticas/bibliográficas e investigações/ ensaios clínicos primeiramente após leitura do título, seguida da leitura do resumo e, finalmente, do texto integral.

Numa fase inicial foram obtidos artigos, tendo sido eliminados todos os artigos duplicados e considerados pouco relevantes para o tema em questão. No final, foram considerados 43 artigos.

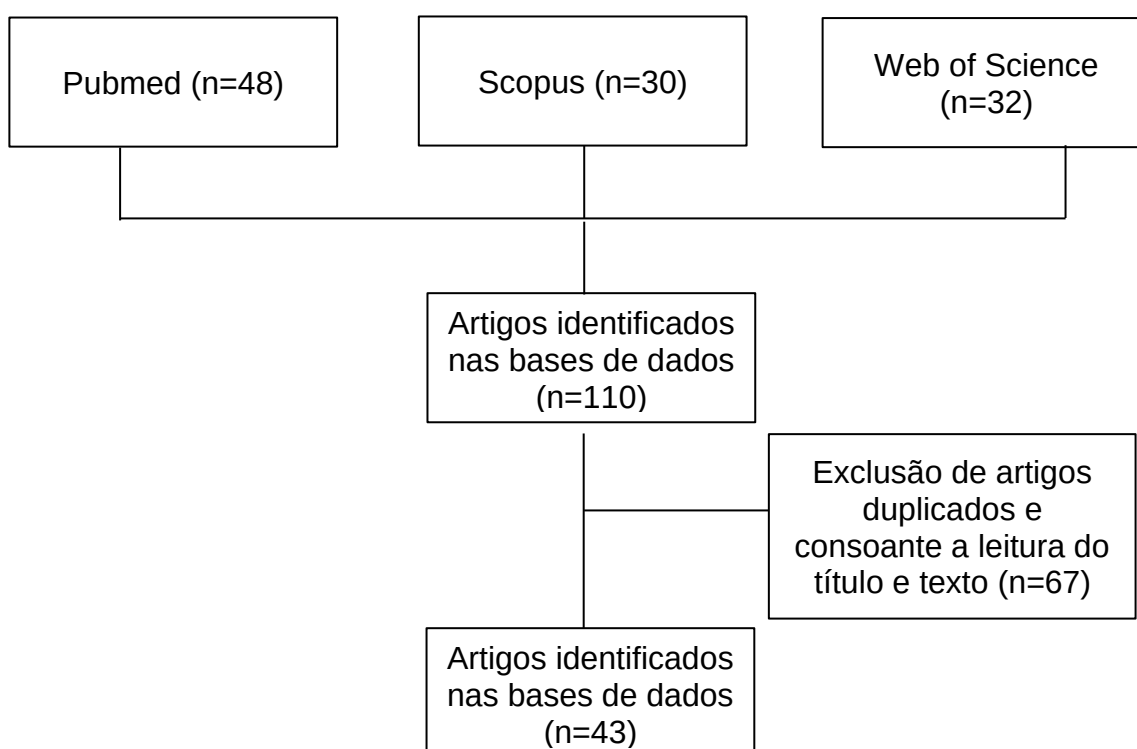


TABELA 1. Fluxograma do processo de busca e seleção de artigos

DESENVOLVIMENTO

Neoplasias malignas da cabeça e do pescoço e a sua relação com o HPV

As neoplasias malignas da cabeça e do pescoço englobam vários grupos de tumores na região da cabeça e do pescoço, à exceção de carcinomas da tiróide e melanomas.⁽¹⁹⁾ Os carcinomas de células escamosas da cabeça e do pescoço (CCECP) constituem o tipo predominante de tumores desta região (cerca de 95%),⁽¹⁹⁾ e surgem em diversas localizações desde a cavidade oral e nasal, à faringe, laringe e seios paranasais, sendo o sexto tipo de cancro mais comum, com uma taxa de mortalidade de 50%, associada a apresentações clínicas tardias.⁽¹⁹⁾ Os restantes 5% pertencem aos adenocarcinomas e outros tipos de cancro.⁽²⁰⁾ Efetivamente, a localização mais comum é a orofaringe, região que se estende verticalmente desde o palato mole à porção superior do osso hióide, e inclui a base e terço posterior da língua.⁽⁷⁾ Os fatores de risco descritos na literatura são o consumo de tabaco (não somente inalatório), bebidas alcoólicas, predisposição genética e a infeção por HPV.⁽²⁰⁾ Estatisticamente, a incidência de cancro orofaríngeo no sexo masculino ultrapassou a de cancro cervical no sexo feminino.^(14, 21)

Etiologicamente, é pertinente dividir o carcinoma de células escamosas da orofaringe (CCEO) em dois tipos: HPV positivo (HPV+), associado à infeção por HPV; e HPV negativo (HPV-), não associado à infeção por HPV. Importa salientar que, os fatores de risco para CCEO HPV+ sobrepõem-se aos fatores de risco associados à infeção por HPV.

A nível molecular, a génese do CCEO HPV+ deve-se à inativação e degradação das proteínas supressoras tumorais p53 e pRb pelas oncoproteínas E6 e E7, unicamente expressas pelo HPV, sendo os principais motores do processo evolutivo da infeção para a carcinogénese. Especificamente, E6 liga-se à proteína supressora tumoral p53 via E6AP (complexo proteico), e degrada-a através de um mecanismo mediado por proteossomas. Para que ocorra a transmissão viral, E7 induz alterações moleculares durante a fase S do ciclo celular, e degrada as proteínas p130 e p107 do retinoblastoma.⁽³⁾ A inibição da apoptose, redução da resposta imunitária contra o vírus via supressão do fator regulador de interferon 3

(TNFR1) são algumas das funções da proteína E6. Assim, E6 e E7 constituem fatores virais primários, responsáveis pela integração do genoma viral no ADN e alterações do ciclo celular, conduzindo ao surgimento de anomalias, instabilidade e dano genómico. ⁽⁵⁾

Em contraste, no caso de infeções por HPV de baixo risco, a baixa afinidade de E6 e E7 para p53 e as proteínas do retinoblastoma, justificam a baixa carcinogenicidade descrita. ⁽³⁾

Desta forma, o vírus invade o epitélio das criptas amígdalinas permitindo o desenvolvimento silencioso do tumor. Poderá permanecer latente durante vários anos até se manifestar clinicamente ou, manifestar sobre a forma de lesões pré-cancerosas que podem tanto regredir (dois, três anos pós-infeção - que é o caso da maioria), como progredir. Assim, as alterações ao nível molecular poderão traduzir-se clinicamente em displasias moderadas a severas, no entanto, visto que ocorrem com frequência nas criptas amígdalinas, de acesso visual difícil e pouco perceptível pelo doente, o seu diagnóstico é frequentemente tardio. ⁽⁷⁾

Apesar da maior probabilidade de envolvimento linfático, diversos estudos têm demonstrado que o prognóstico de CCEO HPV+ é mais favorável face aos CCEO HPV-, que contém mutações disruptivas de p53, associadas a comportamentos mais agressivos. ^(3, 5, 8) Pensa-se que esteja relacionado não só com uma biologia tumoral mais favorável, mas também devido à característica da população cuja prevalência tem sido crescente, isto é, doentes mais jovens e sem comorbilidades significativas associadas. ⁽⁷⁾ Geneticamente, o CCEO HPV- apresenta elevada taxa de mutação de p53 e ab-rogação do *checkpoint* G1/S do ciclo celular, via deleção de CDKN2A/B e/ou amplificação de CCND, enquanto o CCEO HPV+ é marcado por mutações recorrentes dos complexos PTEN, TRAF3, PIK3CA e amplificação de E2F1. ⁽²²⁾

Por um lado, a incidência do CCEO HPV+ tem vindo a aumentar entre os jovens a um ritmo alarmante, principalmente devido à crescente infeção por HPV e a evolução do papel da sexualidade na sociedade, que principia cada vez mais cedo, e com um maior número de parceiros sexuais. ⁽⁵⁾ Por outro lado, a incidência do CCEO HPV- diminuiu, associada à redução de hábitos tabágicos. ⁽¹²⁾

A infeção pelo vírus Eipstein-Bar poderá também ser uma causa do desenvolvimento de tumores na região nasofaríngea, em contraste com as neoplasias associadas a HPV, mais habituais na região da orofaringe. ^(2, 20)

No que diz respeito a manifestações clínicas, também estas duas entidades (CCEO HPV– e CCEO HPV+) se diferenciam. No CCEO HPV+ surge com frequência uma massa tumoral, enquanto os pacientes com CCEO HPV– apresentam queixas de disfagia, disartria e odinofagia, dependendo da localização tumoral. ⁽²³⁾

Diagnóstico

É de salientar que antes de estabelecer o diagnóstico, importa excluir determinadas patologias que podem apresentar manifestações clínicas similares ao CCEO como: eritroplasia, líquen plano, leucoplasias, candidíase oral, lesões liquenóides, queratose actínica, entre outras.⁽⁷⁾

Realizado o diagnóstico diferencial, segue-se a aplicação de um protocolo composto por uma série de exames clínicos e radiológicos, que despistam ou confirmam o diagnóstico de CCEO, culminando na biópsia tecidular invasiva. Caso estejamos na presença de uma massa ao nível do pescoço é recomendada a ecografia com ou sem biópsia com agulha aspirativa, uma vez que permite concluir de forma precisa o estadiamento, na condição de ser aplicada por um operador experiente. Igualmente adequada para avaliar o estadiamento do tumor primário, é a ressonância magnética, que apresenta como vantagem a reduzida distorção na presença de restaurações metálicas presentes em boca. A tomografia computadorizada (TAC) é por sua vez indicativa do tamanho do tumor, assessorando a decisão de remoção cirúrgica e a extensão do tumor para gânglios linfáticos.⁽⁷⁾

Por último, e talvez mais importante, a biópsia da lesão suspeita permite obter o diagnóstico definitivo. Este último passo vem acompanhado pela realização de endoscopia ou laringoscopia, de forma a possibilitar a visualização e excisão da região suspeita.

No contexto do diagnóstico de CCEO HPV+, a Sociedade Americana de Clínica Oncológica (ASCO) advoga a testagem de HPV em todos os CCEO recentemente diagnosticados através de testes PCR ou qRT-PCR (*quantitative reverse transcription-PCR*) para detetar ADN ou RNA de HPV, e coloração imunohistoquímica para a deteção da proteína p16.^(3, 7) À semelhança do exame papanicolau que avalia indícios de cancro cervical HPV+, também a testagem salivar poderá ter este papel, e permitir a efetivação de um diagnóstico precoce.⁽⁸⁾ Técnicas como a coloração imunohistoquímica para p16 e hibridização *in situ* para HPV, têm demonstrado alta sensibilidade e poderão ser executadas a partir de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina.⁽²⁴⁾

Na prática, na maior parte dos casos surgem tumores primários de pequena dimensão (estadiamento T1 ou T2) e metástases ao nível dos gânglios linfáticos.

No entanto, este tipo de apresentação poderá ser facilmente confundido com lesões benignas, pelo que é aconselhada a confirmação do diagnóstico mediante ecografia e biópsia aspirativa por agulha fina. ⁽²⁵⁾

1. Biópsia Líquida vs Biópsia Tecidular

Como vimos, a estratégia standard na confirmação do diagnóstico e monitorização de neoplasias inclui intervenções cirúrgicas como a biópsia tecidular, procedimentos consideravelmente invasivos, frequentemente repetidos, e que deixam uma marca no doente, não só física, como psicológica. Além disso, a biópsia tecidular ocorre necessariamente na presença de manifestações clínicas, o que muitas vezes indicia um estadio já avançado da doença. ⁽²⁶⁾

O surgimento da análise de amostras líquidas, como a saliva e o plasma, permite a identificação de alterações moleculares neoplásicas, através de uma técnica não invasiva, de baixo custo, fácil e reprodutível, que não necessita de manifestações clínicas para ser executada, ou seja, torna viável a deteção precoce, é simples de armazenar e, no caso da recolha salivar, não requer formação prévia por parte do profissional que executa a recolha de amostras. Efetivamente, a taxa de sobrevivência de CCEO HPV+ atinge os 90% em casos detetados precocemente, em contraste com os 40% caso a deteção seja tardia. ⁽²⁷⁾

A facilidade de obtenção, juntamente com as informações que contém, como ADN, RNA, proteínas, anticorpos, citocinas, hormonas e microbiota da cavidade oral, tornaram esta alternativa atrativa na área da oncologia. Como já é de conhecimento geral, a cavidade oral reflete em parte a saúde do nosso organismo, e as suas alterações poderão representar quer um problema local, isto é, ao nível da cavidade oral, quer sistémico. Inclusive, já foi utilizada a análise de anticorpos salivares como indicador do *status* de HIV (vírus da imunodeficiência humana) e outras infeções virais e bacterianas. ⁽⁸⁾

A biópsia líquida (salivar e serológica) deteta vesículas extracelulares, células tumorais circulantes (CTCs), células circulantes livres de ADN tumoral (cfDNA) que são libertadas na corrente sanguínea por células cancerígenas em apoptose, autofagia ou necrose. As CTCs são células tumorais em circulação separadas do tumor primário, capazes de migrar e iniciar o processo de metastização. ⁽²⁸⁾ Já as vesículas extracelulares contém ADN, RNA e proteínas, o

que permite a sua integração no papel de mediadores de comunicação intercelular ao regular células alvo e o ambiente. ⁽¹⁵⁾

Atualmente, é considerada uma área de investigação em crescimento, uma vez que estas características moleculares poderão refletir as alterações ao nível do tumor, fornecendo fácil acesso ao seu interior e compreensão do mecanismo de ação. No entanto, a testagem positiva não é necessariamente indicativa de desenvolvimento neoplásico, e essa é uma das limitações associadas a este método. ⁽²⁹⁾

2. Biomarcadores Salivares

Tendo por base da sua constituição 98% de água, e 2% de substâncias orgânicas e inorgânicas, a saliva apresenta funções de extrema importância como defesa antibacteriana, digestão, lubrificação do bolo alimentar, mastigação, deglutição e solubilização. A análise de biomarcadores salivares apresenta vários fins, desde a avaliação de biomarcadores inflamatórios, microrganismos patogénicos periodontais, e biomarcadores associados a patologias orais e sistémicas, tendo sido já utilizados na deteção de neoplasias, como cancro da mama, pâncreas e ovários. ⁽³⁰⁾

Como já foi referido, a recolha de amostras salivares para análise, diagnóstico, prognóstico e monitorização (progressão tumoral e resposta à terapia), apresenta inúmeras vantagens: é indolor, simples, não acarreta grandes custos, é capaz de rastrear uma população grande, conveniente para recolha de múltiplas amostras em tempos diferentes e mais fácil de armazenar e recolher, em contraste com o plasma. ⁽⁸⁾

2.1 ADN

A análise de ADN via PCR, para diagnóstico de casos de CCEO HPV+ tem sido extensamente estudada, e atualmente dá-se início à entrada de produtos no mercado para este fim. A maioria dos estudos utiliza *primers* para a região L1 ou E6/E7 do vírus, porém, a região L1 é frequentemente eliminada quando o vírus é integrado no genoma humano, por isso, sistemas de *primers* que utilizam as oncoproteínas E6 e E7 tendem a ser mais sensíveis e específicos, uma vez que são conservados durante a integração e são cruciais para o processo de

carcinogénese. No entanto, E6 e E7 são específicos para HPV-16, o tipo de HPV oncogénico mais comum, porém, não único. A abordagem para testar outros tipos de alto risco (como 18 e 33) terá de ser adaptada para outras proteínas, no entanto, cerca de 90 a 95% dos CCEO HPV+ são do tipo 16. ⁽⁸⁾ Dependendo do método utilizado, qPRC (PCR quantitativo) ou ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) que permite a deteção de anticorpos, antigénios, proteínas e glicoproteínas, o uso de ADN de HPV do tipo 16 como biomarcador salivar, é capaz de identificar uma infeção prevalente que poderá ou não conduzir ao desenvolvimento de CCEO HPV+. A vacinação profilática (e mais recentemente, terapêutica) apresentam um papel crucial para diminuir uma eventual progressão. Na verdade, a vacinação contra o HPV mostra uma eficácia de mais de 90% em lesões anogenitais pré-cancerosas, e induz anticorpos HPV ao nível da cavidade oral e fluidos circulantes. ⁽⁹⁾

2.2 Células circulantes livres de ADN e RNA tumoral (cfDNA e cfRNA)

Está comprovado que as cfDNA fornecem informações complementares como o número de mutações somáticas de amplificação ou eliminação de um ou mais alelos de segmentos genómicos, igualmente designado de *copy number aberrations* (CNAs) e quantificação da instabilidade genómica, ou *copy number instability* (CNI). Concluiu-se que o parâmetro CNI poderá ser relevante no que diz respeito ao prognóstico, e os CNAs estão altamente associados à metastização. ⁽³¹⁾

A metilação de ADN é um processo epigenético associado ao desenvolvimento de neoplasias, dado que resulta na redução ou inativação de expressão genética. Desta forma, E6 e E7, são capazes de modular a metilação de ADN de genes supressores tumorais, silenciando-os, e consequentemente, perdendo a sua função reparadora. Esta avaliação é feita com recurso a uma técnica de PCR quantitativa específica para metilação (Q-MSP), que permitiu a distinção entre pacientes saudáveis e pacientes com CCEO HPV+. ⁽³¹⁾

2.3 RNA

A utilização de RNA mensageiro (RNAm) e microRNAs (miRNAs) tem sido igualmente estudada no sentido de diagnosticar CCEO HPV+. Visto que são produtos resultantes da transcrição génica, faz sentido que sejam empregues RNAm codificantes para as proteínas E6 e E7. Já os miRNAs apresentam um papel crucial no processo neoplásico, dado que consistem em regiões não codificantes que regulam a expressão genética ao inibir a tradução de determinados RNAm, tendo sido já provada a sua capacidade de detetar CCEO induzidos por HPV.⁽³²⁾ De acordo com a literatura, miRNA-9, -134, -196b, -210 e -455, foi a melhor combinação de miRNAs utilizados como biomarcadores desta condição patológica.⁽³³⁾

2.4 Proteínas (anticorpos HPV, p16 e CD44)

Quando o organismo deteta a presença de um vírus, parte da resposta imunológica consiste na produção de IgG e IgA, imunoglobulinas que são expressas como resposta ao vírus. D'Souza G et al. comprovaram a eficácia da utilização de anticorpos para a oncoproteína E6, presentes na saliva, na deteção de CCEO HPV+ com taxas de 88% especificidade e 98% de sensibilidade.⁽³⁴⁾ Na literatura é possível encontrar ainda vários estudos com a utilização de anticorpos para E7 e L1.⁽³⁵⁾

Também a presença de CD44 (glicoproteína transmembranar) constitui um marcador tecidual já comprovado, cuja expressão é indicativa de um mau prognóstico, estando associada a processos de metastização e grande expansão tumoral, no entanto, ainda são escassos os estudos que avaliam a sua viabilidade na qualidade de biomarcador em secreções salivares.^(19, 36) Concluiu-se, porém, que a sua especificidade enquanto biomarcador será baixa uma vez que não distingue CCEO HPV- de CCEO HPV+. ⁽³⁶⁾ Outros biomarcadores como a CXCL-8, anticorpos anti-p53 e ciclina D1 não foram avaliados enquanto biomarcadores presentes na saliva e respetivas utilidades.

3. Testes comercializados

Smith et al. Começa por abordar o OraRisk HPV Complete Genotyping test, que reconhece 51 tipos de HPV (incluindo 14 tipos de alto risco), envolve PCR com primers de ADN específicos para a região L1, e uma série de passos que resultam na análise por eletroforese microcapilar. ⁽⁸⁾

Na verdade, 3 dos testes já comercializados, Arbor Vita's OncoE6 (deteção de E6), Hologic's Aptima HPV Assay (mRna E6 E E7) e Roche's cobas HPV 4800 DNA testing (PCR) foram capazes de detetar HPV, quer por aspiração de agulha fina, como por amostras salivares a partir de pacientes com CCEO. ⁽³⁷⁾ No entanto, os resultados da deteção demonstram valores muito mais baixos quando comparados técnicas de aspiração de agulha fina.

Estudo	Nome do teste	Método de deteção	Sensibilidade e Especificidade
Smith et al. ⁽⁸⁾	OraRisk HPV Complete Genotyping test	Deteção tipos de HPV via PCR	Sem dados
Chernesky et al. ⁽³⁷⁾	Arbor Vita's OncoE6	Deteção de E6 via	Sensibilidade 6,2% Especificidade 100%
Chernesky et al. ⁽³⁷⁾	Hologic's Aptima HPV Assay	Deteção de mRNA de E6 e E7 (de 14 tipos de HPV de alto risco)	Sensibilidade 45,8% Especificidade 100%
Chernesky et al. ⁽³⁷⁾	Roche's cobas HPV 4800 DNA testing	Deteção tipos de HPV via PCR	Sensibilidade 76,1% Especificidade 90,9%
Cohen et al. ⁽³⁸⁾	Hologic's Cervista HR	Deteção de sequências específicas de ADN (alvos E6 e	Sensibilidade 100% Especificidade 33%

		E7)	
Cohen et al. ⁽³⁸⁾	Cercista HPV Genotype	Deteção de sequências específicas de ADN e tem como alvo E6 e E7	Sensibilidade 100% Especificidade 14%
Jang et al. ⁽³⁹⁾	Atila BioSystems' Ampfire HPV assay	Deteção de várias regiões do genoma viral	Sensibilidade 40,3% Especificidade 93,3%
Katanga et al. ⁽⁴⁰⁾	Hybrid Capture 2	Deteção de sequências de ADN	Sensibilidade 91,1% Especificidade 83,7%

TABELA 2. Testes salivares disponíveis para a detecção de CCEO HPV+, respectivo método de detecção, sensibilidade e especificidade

Estadiamento de CCEO HPV+

O estadiamento neoplásico é avaliado consoante um sistema designado TNM (Tumor, Node, Metastasis), em que T é referente à extensão do tumor primário, N ao envolvimento de gânglios linfáticos regionais, e M a extensão de metástases. A edição mais recente da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), baseada no estudo de coortes *Oropharyngeal Cancer Network for Staging* (ICON-S), modificou este sistema para um estadiamento que diferencia CCEO HPV+ e CCEO HPV-, como duas entidades distintas, dado que apresentam diferentes perfis moleculares e consequentemente diferentes *outcomes*. Algumas das mudanças implicam a consideração do status de HPV e a sua correlação com metástases em gânglios linfáticos, para impedir um estadiamento incorreto, e consequentemente, tratamento inadequado. (7, 41)

De salientar que, a positividade para HPV é o fator não anatómico mais fiável para o avaliar o prognóstico e o *outcome* de CCEO, o que vem justificar a importância da incorporação deste parâmetro. Desta forma, o novo sistema de classificação permite uma discriminação detalhada e melhor estratificação de risco em pacientes com CCEO HPV+.

Frequentemente, estes pacientes apresentam um envolvimento linfático precoce e tumor primário de pequenas dimensões, em comparação com indivíduos com CCEO HPV-. Estas características poderão estar relacionadas com dois fatores: primeiro a falta de camadas de tecido conjuntivo subepitelial abaixo do epitélio das criptas amígdalinas; e segundo, as células tumorais da camada basal tendem a migrar para os gânglios linfáticos da região do pescoço, ainda antes do tumor primário assumir uma proporção suficiente para que seja detetada num exame clínico. (42)

Face à sétima edição, algumas das alterações são a eliminação das categorias T4a e T4b, que não apresentavam distinção ao nível do prognóstico, a introdução de um novo critério - profundidade de invasão do tumor primário e extensão extra ganglionar. De salientar que, o estadiamento N patológico é aplicável apenas em indivíduos submetidos a cirurgia. (41)

No entanto, ainda há aspetos a melhorar que devem ser considerados em investigações futuras, como a junção do estadiamento clínico e patológico, e qual a melhor metodologia para avaliar e interpretar a positividade de HPV. (41) A

aplicabilidade deste sistema de estadiamento ainda não foi totalmente estabelecida.

Tumor Primário (T)	Nódulos Linfáticos Regionais (N) - Patológico	Nódulos Linfáticos Regionais (N) - Clínico	Metástases (M)	Status de HPV
T0 – Tumor primário não identificado	NX – nódulos linfáticos não comprometidos	N1 - nódulos linfáticos ipsilaterais ≤ 6cm	M0 – Sem metástases distantes	Testagem de p16
T1 – Tumor ≤ 2cm na sua dimensão máxima	pN0 – Sem metástases em nódulos regionais	N2 – nódulos ≤ 6cm bilaterais ou contralaterais	M1 – Com metástases distantes	
T2 – Tumor > 2cm mas ≤ 4cm na sua dimensão máxima	pN1- envolvimento de ≤ 4 nódulos linfáticos	N3 – nódulos > 6cm		
T3 - Tumor > 4cm na sua dimensão máxima ou extensão para a superfície lingual da epiglote	pN2 - envolvimento > 4 nódulos linfáticos			
T4 – Doença local moderadamente avançada, tumor invade a laringe, músculo extrínseco da lingual, pterigoide mesial, palato duro, mandíbula ou além				

TABELA 3. Estadiamento de CCEO HPV+ segundo a 8ª edição da AJCC (2017)

Papel do Médico Dentista e Incorporação da Testagem em Ambiente Clínico

Associado à lotação dos hospitais, e à incapacidade em dar resposta a todos os doentes oncológicos, principalmente aos que se encontram em vigilância ou monitorização, o médico dentista poderá contribuir nesse sentido, de forma ativa, com um olhar atento e crítico que permita em última instância melhorar o prognóstico, e diminuir a taxa de mortalidade associada ao CCEO.

Alguns elementos-chave que devem ser tidos em conta aquando da discussão sobre a utilidade de rastrear indivíduos saudáveis para a presença de HPV na saliva incluem, de que forma estes resultados irão ter um impacto clínico na tomada de decisão e se apresenta uma boa relação custo-benefício. ^(13, 34) Estudos mais recentes estimam que dos resultados positivos para HPV via testes salivares, 1 em cada 10 indivíduos acaba por desenvolver CCEO, por isso é crucial avaliar a utilidade, custo dos testes e das várias técnicas de monitorização, que indivíduos têm indicação para os realizar, e com que frequência. ⁽¹³⁾

Atualmente, não há benefícios claros de um rastreio populacional indefinido que compensem danos associados a potenciais falsos positivos. A identificação de indivíduos portadores de HPV de alto risco poderá ser complexo, tendo em conta a ausência de diretrizes de vigilância, e o período entre a positividade do biomarcador e o desenrolar de um mecanismo carcinogénico. ⁽³⁴⁾

Para uma eficaz gestão de recursos, importa definir que indivíduos teriam indicação para realizar a testagem, sendo a elaboração de um questionário, aquando da realização da anamnese, uma forma de selecionar indivíduos de interesse (que integrem os grupos de risco). Posto isto, o questionário deverá conter algumas informações como sexo (sexo masculino apresenta maior prevalência), idade (>18 anos, tendo em conta o início das práticas sexuais cada vez mais precoce), historial passado ou familiar de CCEO e comportamentos sexuais de alto risco (relações sexuais desprotegidas, mais do que um parceiro sexual, sexo oral recetivo).⁽⁴³⁾ Um vez que CCEO HPV+ é uma entidade distinta de CCEO HPV-, fatores de risco como os hábitos tabágicos e consumo de álcool não integram esta lista.⁽¹³⁾ Com base nestas respostas e no exame clínico (assintomático, ou na presença de lesões suspeitas) deverá ser realizado o teste.

Assim, o teste deverá cumprir os seguintes requisitos: ser de baixa

complexidade, reproduzível, baixo custo, de recolha e armazenamento fáceis, deve estar disponível a nível global, com análise e interpretação de resultados em laboratório. ⁽⁸⁾

DISCUSSÃO

O status da infecção por HPV é atualmente um fator prognóstico importante em pacientes com CCEO. Existem diversos mecanismos moleculares, como a expressão das oncoproteínas E6 e E7 do HPV, evasão imunológica, instabilidade genómica, integração do ADN viral no genoma do hospedeiro, alterações na metilação global do ADN e expressão genética, indicativos da sua progressão.⁽⁵⁾

A utilização de biomarcadores salivares como ADN, RNA e proteínas para CCEO HPV+ tem sido extensamente estudado nos últimos anos, sendo o ADN o biomarcador de eleição que maior consenso reúne. Relativamente aos métodos de deteção, primeiramente terá surgido a deteção da região L1 de HPV tipo 16, e mais tarde, foram desenvolvidos *primers* para identificar E6 e E7, que demonstraram ser ainda mais específicos e sensíveis. Sendo E6 e E7 as oncoproteínas mais relevantes no processo da evolução da infecção para carcinogénese, o uso de qRT-PCR para a sua deteção é o método recomendado para confirmar o envolvimento de HPV em neoplasias malignas.⁽⁸⁾

Os biomarcadores salivares de RNA tendem a ser instáveis e, por isso, menos fiáveis, no entanto são necessários mais estudos relativamente ao método de preservação de RNA em amostras salivares, até porque a expressão de RNA é capaz de identificar o tumor com maior precisão que o ADN.⁽⁸⁾

A maior limitação descrita consiste na distinção entre a deteção de tipos de HPV oncogénicos em amostras salivares e o diagnóstico efetivo de CCEO HPV+, isto é, não diferencia se a infecção por HPV está associada a tecido tumoral ou não, uma vez que a maioria das infeções regride ao fim de 1-4 anos, aproximadamente. Por esta razão, a testagem positiva não é necessariamente indicativa de desenvolvimento neoplásico. A análise de PCR, ao detetar deposições virais de outros locais, poderá tornar este um método isoladamente pouco preciso e inespecífico, incapaz de distinguir entre carcinogénese provocada por infecção e uma infecção por HPV comum. Outra limitação é o tempo, e recursos laboratoriais necessários.⁽²⁹⁾

Na qualidade de biomarcador, os biofluidos orais apresentam várias vantagens face aos biomarcadores serológicos, particularmente devido à sua elevada proximidade com tumores primários, e fácil recolha. No entanto, a

preservação de informação face à presença de outros componentes enzimáticos, torna-se um desafio, comparativamente a amostras serológicas.⁽⁸⁾ Os biomarcadores salivares descritos ainda se encontram em fase de investigação, sendo necessária exploração mais aprofundada para que sejam introduzidos na prática clínica. Está provado que o tratamento atempado melhora consideravelmente o prognóstico dos pacientes, e em tempos de infeção crescente por HPV, principalmente em faixas etárias cada vez mais jovens, torna-se impreterível a otimização de um método de diagnóstico eficaz e fidedigno com base em biomarcadores que determinem o verdadeiro potencial diagnóstico. Além de diagnóstico, também apresentam utilidade na monitorização do pós-tratamento, e possíveis recidivas.⁽⁵⁾

Dos testes salivares abordados, numa primeira fase de rastreio importa optar pelo teste que apresenta maior sensibilidade para obter o menor número de falsos positivos, neste caso *Hologic's Cervista HR* e *Cercista HPV Genotype*. E só depois, aplicar os testes com maior especificidade aos indivíduos com resultado positivo (*Hologic's Aptima HPV Assay* e *Arbor Vita's OncoE6*).⁽³⁸⁻⁴⁰⁾ No caso de positividade de contágio por HPV sem sinais e sintomas clínicos de carcinoma, o aconselhado será manter o paciente em vigilância apertada, com recurso a exames complementares que permitam perceber a evolução biológica do vírus.⁽³⁷⁾

Relativamente aos métodos de prevenção, a vacinação contra a infeção por HPV tem sido um triunfo a nível de saúde pública, no entanto, persiste a necessidade de melhorar métodos de controlo e prevenção de patologias associadas a HPV. Algumas das alternativas descritas na literatura são o desenvolvimento de uma vacina com amplo espectro para tipos de HPV oncogénicos, redução do custo de vacinação, redução da dose mínima necessária, melhorar o acesso global à vacinação profilática de HPV e aplicar o conhecimento imunológico corrente para desenvolver vacinas terapêuticas eficazes.⁽⁹⁾ Assim, os esforços persistentes no desenvolvimento de vacinas terapêuticas e profiláticas dirigidas para o HPV terão um impacto certamente positivo na redução global do HPV, bem como na diminuição das taxas de infeção em milhões de pessoas anualmente.⁽⁹⁾

CONCLUSÃO

A evidência científica é clara face às vantagens de um diagnóstico de CCEO HPV+ precoce e atempado. A testagem salivar é um método viável que pode ser utilizado para avaliar tanto a predisposição quanto o diagnóstico, monitorização e resposta à terapia. A inclusão da testagem salivar na prática clínica de pacientes de alto risco apresenta uma relação custo-benefício favorável, no entanto, é necessária maior investigação para uma melhor compreensão dos candidatos à avaliação dos biomarcadores circulantes, bem como na validação da sua aplicabilidade. Apesar da disponibilidade de diversos testes e novas técnicas não invasivas, ainda não há consenso sobre a melhor técnica a ser empregue. Em relação aos biomarcadores utilizados, os métodos à base da detecção de ADN de HPV são superiores face aos de detecção de RNA.

Além da prevenção primária (hábitos sexuais seguros, controlo de hábitos tabágicos e consumo de álcool), a vacinação profilática dirigida ao HPV demonstra uma eficácia de mais de 90% na prevenção do desenvolvimento de lesões anogenitais pré-cancerosas. Também a vacinação terapêutica parece ser uma área com potencial.

Adicionalmente, é crucial a criação de uma equipa de profissionais qualificados constituída por oncologista, psicoterapeuta, médico dentista, nutricionista, histopatologista, cirurgião, radiologista, otorrinolaringologista para que a colaboração conjunta resulte no melhor *outcome* possível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Roman BR, Aragonés A. Epidemiology and incidence of HPV-related cancers of the head and neck. *J Surg Oncol*. 2021;124(6):920-2.
2. Arantes L, De Carvalho AC, Melendez ME, Lopes Carvalho A. Serum, plasma and saliva biomarkers for head and neck cancer. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018;18(1):85-112.
3. Pinkiewicz M, Dorobisz K, Zatonski T. Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancers. Where are We Now? A Systematic Review. *Cancer Manag Res*. 2022;14:3313-24.
4. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*. 2013;445(1-2):138-68.
5. Sano D, Oridate N. The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2016;21(5):819-26.
6. Shah A, Malik A, Garg A, Mair M, Nair S, Chaturvedi P. Oral sex and human papilloma virus-related head and neck squamous cell cancer: a review of the literature. *Postgrad Med J*. 2017;93(1105):704-9.
7. Jamal Z, Anjum F. Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *StatPearls*. Treasure Island (FL)2023.
8. Smith DH, Raslan S, Samuels MA, Iglesias T, Buitron I, Deo S, et al. Current salivary biomarkers for detection of human papilloma virus-induced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2021;43(11):3618-30.
9. Farmer E, Cheng MA, Hung CF, Wu TC. Vaccination Strategies for the Control and Treatment of HPV Infection and HPV-Associated Cancer. *Recent Results Cancer Res*. 2021;217:157-95.
10. Tang KD, Vasani S, Taheri T, Walsh LJ, Hughes BGM, Kenny L, et al. An Occult HPV-Driven Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Discovered Through a Saliva Test. *Front Oncol*. 2020;10:408.
11. Kumarasamy C, Madhav MR, Sabarimurugan S, Krishnan S, Baxi S, Gupta A, et al. Prognostic Value of miRNAs in Head and Neck Cancers: A Comprehensive Systematic and Meta-Analysis. *Cells*. 2019;8(8).
12. Mahal BA, Catalano PJ, Haddad RI, Hanna GJ, Kass JI, Schoenfeld JD, et al. Incidence and Demographic Burden of HPV-Associated Oropharyngeal Head and Neck Cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2019;28(10):1660-7.
13. Kacew AJ, Hanna GJ. Value and Unmet Needs in Non-Invasive Human Papillomavirus (HPV) Testing for Oropharyngeal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2021;13(3).
14. Ekanayake Weeramange C, Liu Z, Hartel G, Li Y, Vasani S, Langton-Lockton J, et al. Salivary High-Risk Human Papillomavirus (HPV) DNA as a Biomarker for HPV-Driven Head and Neck Cancers. *J Mol Diagn*. 2021;23(10):1334-42.
15. Chantre-Justino M, Alves G, Delmonico L. Clinical applications of liquid biopsy in HPV-negative and HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma: advances and challenges. *Explor Target Antitumor Ther*. 2022;3(4):533-52.
16. Hanna GJ, Lau CJ, Mahmood U, Supplee JG, Mogili AR, Haddad RI, et al. Salivary HPV DNA informs locoregional disease status in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2019;95:120-6.
17. Senkomago V, Henley SJ, Thomas CC, Mix JM, Markowitz LE, Saraiya M. Human Papillomavirus-Attributable Cancers - United States, 2012-2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2019;68(33):724-8.
18. Robinson M. HPV Testing of Head and Neck Cancer in Clinical Practice. *Recent Results Cancer Res*. 2017;206:101-11.
19. Adeoye J, Brennan PA, Thomson P. "Search less, verify more"-Reviewing salivary biomarkers in oral cancer detection. *J Oral Pathol Med*. 2020;49(8):711-9.
20. Polanska H, Raudenska M, Gumulec J, Sztalmachova M, Adam V, Kizek R, et al. Clinical significance of head and neck squamous cell cancer biomarkers. *Oral Oncol*. 2014;50(3):168-77.

21. Lechner M, Jones OS, Breeze CE, Gilson R. Gender-neutral HPV vaccination in the UK, rising male oropharyngeal cancer rates, and lack of HPV awareness. *Lancet Infect Dis.* 2019;19(2):131-2.
22. Sastre-Garau X, Harle A. Pathology of HPV-Associated Head and Neck Carcinomas: Recent Data and Perspectives for the Development of Specific Tumor Markers. *Front Oncol.* 2020;10:528957.
23. McIlwain WR, Sood AJ, Nguyen SA, Day TA. Initial symptoms in patients with HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.* 2014;140(5):441-7.
24. Lechner M, Liu J, Masterson L, Fenton TR. HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol.* 2022;19(5):306-27.
25. Khalid MB, Ting P, Pai A, Russo JL, Bakst R, Chai RL, et al. Initial presentation of human papillomavirus-related head and neck cancer: A retrospective review. *Laryngoscope.* 2019;129(4):877-82.
26. Brooks PJ, Malkin EZ, De Michino S, Bratman SV. Isolation of salivary cell-free DNA for cancer detection. *PLoS One.* 2023;18(5):e0285214.
27. Huang SH, Xu W, Waldron J, Siu L, Shen X, Tong L, et al. Refining American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control TNM stage and prognostic groups for human papillomavirus-related oropharyngeal carcinomas. *J Clin Oncol.* 2015;33(8):836-45.
28. Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):404.
29. Bettampadi D, Villa LL, Ponce EL, Salmeron J, Sirak BA, Abrahamsen M, et al. Oral human papillomavirus prevalence and type distribution by country (Brazil, Mexico and the United States) and age among HPV infection in men study participants. *Int J Cancer.* 2020;146(11):3026-33.
30. Saxena S, Sankhla B, Sundaragiri KS, Bhargava A. A Review of Salivary Biomarker: A Tool for Early Oral Cancer Diagnosis. *Adv Biomed Res.* 2017;6:90.
31. Misawa K, Imai A, Matsui H, Kanai A, Misawa Y, Mochizuki D, et al. Identification of novel methylation markers in HPV-associated oropharyngeal cancer: genome-wide discovery, tissue verification and validation testing in ctDNA. *Oncogene.* 2020;39(24):4741-55.
32. Salazar C, Nagadia R, Pandit P, Cooper-White J, Banerjee N, Dimitrova N, et al. A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell Oncol (Dordr).* 2014;37(5):331-8.
33. Wan Y, Vagenas D, Salazar C, Kenny L, Perry C, Calvopina D, et al. Salivary miRNA panel to detect HPV-positive and HPV-negative head and neck cancer patients. *Oncotarget.* 2017;8(59):99990-100001.
34. D'Souza G, Clemens G, Troy T, Castillo RG, Struijk L, Waterboer T, et al. Evaluating the Utility and Prevalence of HPV Biomarkers in Oral Rinses and Serology for HPV-related Oropharyngeal Cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2019;12(10):689-700.
35. Loimaranta V, Sievi K, Werner J, Pawlita M, Waterboer T, Butt J, et al. Comparison of multiplex-serology and ELISA based methods in detecting HPV16 L1 antibody responses in paired saliva and serum samples of healthy men. *J Virol Methods.* 2019;270:26-33.
36. Cohen ER, Reis IM, Gomez-Fernandez C, Smith D, Pereira L, Freiser ME, et al. CD44 and associated markers in oral rinses and tissues from oral and oropharyngeal cancer patients. *Oral Oncol.* 2020;106:104720.
37. Chernesky M, Jang D, Schweizer J, Arias M, Doerwald-Munoz L, Gupta M, et al. HPV E6 oncoproteins and nucleic acids in neck lymph node fine needle aspirates and oral samples from patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Papillomavirus Res.* 2018;6:1-5.
38. Cohen N, Gupta M, Doerwald-Munoz L, Jang D, Young JE, Archibald S, et al. Developing a new diagnostic algorithm for human papilloma virus associated oropharyngeal carcinoma: an investigation of HPV DNA assays. *J Otolaryngol Head Neck Surg.* 2017;46(1):11.
39. Jang D, Shah A, Arias M, Ratnam S, Smieja M, Chen X, et al. Performance of AmpFire HPV assay on neck cervical lymph node aspirate and oropharyngeal samples. *J Virol Methods.* 2020;279:113840.

40. Katanga J, Kjaer SK, Manongi R, Wu CS, Iftner T, Waldstrom M, et al. Performance of careHPV, hybrid capture 2 and visual inspection with acetic acid for detection of high-grade cervical lesion in Tanzania: A cross-sectional study. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218559.
41. Machczynski P, Majchrzak E, Niewinski P, Marchlewska J, Golusinski W. A review of the 8th edition of the AJCC staging system for oropharyngeal cancer according to HPV status. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(9):2407-12.
42. Billfalk-Kelly A, Yu E, Su J, O'Sullivan B, Waldron J, Ringash J, et al. Radiologic Extranodal Extension Portends Worse Outcome in cN+ TNM-8 Stage I Human Papillomavirus-Mediated Oropharyngeal Cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2019;104(5):1017-27.
43. Wierzbicka M, Klusmann JP, San Giorgi MR, Wuerdemann N, Dikkers FG. Oral and laryngeal HPV infection: Incidence, prevalence and risk factors, with special regard to concurrent infection in head, neck and genitals. *Vaccine*. 2021;39(17):2344-50.

ANEXOS



DECLARAÇÃO Mestrado Integrado em Medicina Dentária

Monografia/Relatório de Estágio

Identificação do autor

Nome completo Ana Teresa Carneiro Teixeira

N.º de identificação civil 14617559 N.º de estudante 201706467

Email institucional up201706467@up.pt

Email alternativo ana.teixeira_tvx@hotmail.com TII/TIM 910684239

Faculdade/instituto Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto

Identificação da publicação

Dissertação de Mestrado Integrado (Monografia) ☒

Relatório de Estágio ☐

Título completo

"Detecção Precoce de Neoplasias Iniciais de Cabeça e do Pescoço - Induzidas por HPV - através de Saliva" / "Early Detection of Head and Neck Cancer - HPV induced - through Saliva"

Orientador Professor Doutor Tiago Pires de Almeida (ambr)

Coorientador Professor Doutor Pedro de Sousa Gomes

Palavras-chave HPV ; Head and Neck ; Saliva ; Biomarkers ; Tishay
CANCER

Autorizo a disponibilização imediata do texto integral no Repositório da U.Porto: ☒ (x)

Não Autorizo a disponibilização imediata do texto integral no Repositório da U.Porto: ☐ (x)

Autorizo a disponibilização do texto integral no Repositório da U.Porto, com período de embargo, no prazo de:

6 Meses: _____ ; 12 Meses: _____ ; 18 Meses: _____ ; 24 Meses: _____ ; 36 Meses: _____ ; 120 Meses: _____

Justificação para a não autorização imediata _____

Data 22 / 05 / 2023

Assinatura Ana Teresa Carneiro Teixeira

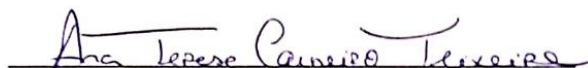
DECLARAÇÃO

Monografia/Relatório de Estágio

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia/Relatório de Estágio, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria e todas as fontes foram devidamente referenciadas.

Porto, 22 de maio de 2023

A Estudante



(Ana Teresa Carneiro Teixeira)



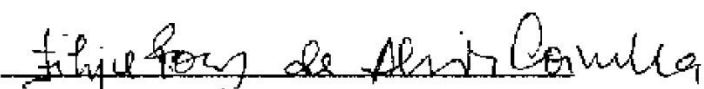
FACULDADE DE
MEDICINA DENTÁRIA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Parecer do Orientador

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pela Estudante Ana Teresa Carneiro Teixeira com o título: "Detecção Precoce de Neoplasias Malignas da Cabeça e do Pescoço - Induzidas por HPV - através da Saliva" / "Early Detection of Head and Neck Cancer – HPV Induced - through Saliva" está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 22 de maio de 2023

O Orientador


(Professor Doutor Filipe Poças de Almeida Coimbra)

Parecer do Coorientador

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pela Estudante Ana Teresa Carneiro Teixeira com o título: “Detecção Precoce de Neoplasias Malignas da Cabeça e do Pescoço - Induzidas por HPV - através da Saliva” / “Early Detection of Head and Neck Cancer – HPV Induced - through Saliva” está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

Porto, 22 de maio de 2023

O Coorientador

Assinado por: **Pedro de Sousa Gomes**
Num. de Identificação: 11876051
Data: 2023.05.22 08:28:46+01'00'



(Professor Doutor Pedro de Sousa Gomes)

DECLARAÇÃO

(Entrega do trabalho final de Monografia, após a respetiva apresentação pública, com o cumprimento das recomendações de alteração solicitadas pelo respetivo Júri da Prova)

Declara-se que, relativamente ao Trabalho de Monografia com o título:
"Detecção Precoce de Neoplasias Malignas da Cabeça e do Pescoço - induzidas por HPV - através da Saliva" /
"Early Detection of Head and Neck Cancer - HPV Induced - through Saliva"

foram cumpridas todas as recomendações de alteração feitas pelo respetivo Júri, após apresentação pública da Prova, pelo que se procede à entrega nos Serviços Académicos (seccaoalunos@fmd.up.pt) da:

- Versão definitiva do tr



Assinatura do Autor
Carneiro Teresinha
Assinatura do Orientador
Carneiro Teresinha

- Informático.

20 / 07 / 2023

O/A Estudante

(Nome em maiúsculas) ANA TERESA CARNEIRO TEIXEIRA

(Assinatura)

O/A Orientador

(Nome em maiúsculas) PROFESSOR DOUTOR FILIPE POÇAS DE ALMEIDA COIMBRA

(Assinatura)

Filipe Poças de Almeida Coimbra

