

O papel do papiloma vírus humano nos tumores da cabeça e pescoço

The role of human papillomavirus in head and neck tumors

Nadine Saraiva • Joana Rodrigues • Nuno Bonito • Hugo Prazeres • Eugénia Cruz • Miguel Costa • Margarida Teixeira • Regina Silva
Helena Gervásio

RESUMO

A infeção por Papiloma Vírus Humano (HPV) é um dos fatores de risco para o desenvolvimento de tumores da cabeça e pescoço. Pretende-se avaliar a prevalência do HPV nestes tumores em doentes sem hábitos alcoólicos e tabágicos associados.

A presença de DNA do HPV foi testada por PCR (Polymerase Chain Reaction) em todos os doentes com tumor da cabeça e pescoço identificados entre 2010 e 2013.

Foram identificados 44 doentes, com média de idades de 61.4 anos, com predomínio do sexo masculino. 6 destes doentes foram DNA-HPV positivo, sendo que 50,0% apresentavam um estadio IV A. 66,7% dos doentes foram submetidos a cirurgia e os restantes a quimio-radioterapia concomitante. A sobrevivência global da população DNA-HPV positiva aos 12 e 60 meses foi de 100% e 50%, respetivamente e da população DNA-HPV negativa de 86.8% e 15.8% respetivamente.

Nadine Saraiva

Interna de Oncologia Médica no Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil, EPE;

Joana Rodrigues

Interna de Oncologia Médica no Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil, EPE;

Nuno Bonito

Assistente Hospitalar Oncologia Médica no Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil, EPE.

Hugo Prazeres

PHD Biomedicina – Laboratório de Patologia Molecular, Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil, EPE.

Eugénia Cruz

Assistente Hospitalar de Anatomia Patológica no Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil, EPE.

Miguel Costa

Médico Dentista, Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil, EPE.

Margarida Teixeira

Assistente Hospitalar Oncologia Médica no Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil, EPE.

Regina Silva

Chefe de Serviço Oncologia Médica, Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil, EPE.

Helena Gervásio

Directora do Serviço de Oncologia Médica do Instituto Português de Oncologia de Coimbra, Francisco Gentil, EPE.

Correspondência:

Nadine Correia Saraiva
nad18saraiva@gmail.com

Artigo recebido a 28 de julho de 2017. Aceite para publicação a 31 de julho de 2017.

Na nossa população, 13,6% dos doentes apresentaram positividade para DNA – HPV, o que é comparável com estudos publicados.

Palavras-chave: Papiloma Vírus Humano, tumores da cabeça e pescoço, DNA, álcool, tabaco

ABSTRACT

The human papillomavirus (HPV) infection is a risk factor for the development of tumors of the head and neck. We intend to assess the prevalence of HPV in these tumors in patients without alcohol and tobacco risk factors.

The presence of HPV DNA was tested by PCR (Polymerase Chain Reaction) in all patients with head and neck tumor identified between 2010 and 2013.

44 patients with a mean age of 61.4 years were identified, with a predominance of males. 6 of these patients were HPV-DNA positive, of which 50.0% had a stage IVA. 66.7% underwent surgery and the remaining systemic therapy. The HPV-DNA positive population's overall survival at 12 and 60 months was 100% and 50%, respectively and the HPV-DNA negative population's overall survival was 86.8% and 15.8%, respectively.

In our population, 13.6% of patients were positive for DNA-HPV, which is comparable to published studies.

Keywords: Human Papilloma Virus, tumors of the head and neck, DNA, alcohol, tobacco.

INTRODUÇÃO

Os tumores da cabeça e pescoço são a oitava neoplasia mais comum no mundo.¹ Vários estudos sugerem que a infeção por Papiloma Vírus Humano (HPV), conjuntamente com o consumo de álcool e tabaco, é um fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias da cavidade oral e da orofaringe.² Apesar do consumo tabágico ter diminuído nas últimas décadas, não se verificou uma diminuição proporcional na incidência dos tumores da cabeça e pescoço.² Pelo contrário, verificou-se um aumento exponencial destes tumores, sobretudo nos países desenvolvidos, acreditando-se que seja o HPV o responsável.² Num estudo SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) com casos de carcinomas da cabeça e pescoço diagnosticados entre 1973-2003, mostrou uma redução anual de 1,85% nos tumores relacionadas com o tabagismo, enquanto os tumores relacionadas com o HPV apresentavam um aumentado

anual de 0,8%.³ Efetivamente, o aparecimento de tumores da cavidade oral e da orofaringe em doentes jovens que afirmam nunca ter fumado ou consumido bebidas alcoólicas, faz-nos acreditar que há outros fatores de risco a ter em conta.⁴ O tabaco e o álcool desempenham um fator etiológico importante com efeito combinado multiplicativo e não aditivo.⁴ As infeções virais causadas pelos vírus da imunodeficiência humana (HIV) e Epstein-Barr (EBV) poderão também ter relação na etiologia deste tipo de entidade patológica, sempre em correlação direta com o status genético de cada indivíduo.⁴ Enquanto os tumores da cabeça e pescoço HPV (-) se localizam preferencialmente na cavidade oral, nasofaringe e laringe, os carcinomas HPV (+) localizam-se preferencialmente na orofaringe.³ Além disso, a idade ao diagnóstico de tumores HPV (+) diminuiu em 1,5 anos, enquanto a dos tumores HPV (-) aumentou.³

O HPV pertence à família de papilomavírus, pequeno vírus de ADN de cadeia dupla, que infecta as células epiteliais cutâneas e das mucosas, induzindo a formação de papilomas ou tumores.⁵ Com base na sua associação com o cancro do colo do útero, os tipos de HPV são classificados como de alto risco (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 e 82) ou de baixo risco (HPV- 26, 30, 34, 53, 66, 67, 69, 70, 73, 82 e 85).⁶ Segundo a Organização Mundial de Saúde, existem mais de 140 genótipos de HPV,⁷ acreditando-se que pelo menos 13 dos conhecidos têm potencial oncogénico.⁸ Porém a maioria, mais de 70%, são causados pelo genótipo 16 e 18 que têm capacidade de incorporar o DNA do hospedeiro; os mesmos tipos que provocam o cancro anogenital associado ao HPV.⁹ O HPV-16 é o mais comum, encontrado em quase 90% dos cancros da orofaringe HPV (+).² Atualmente, o HPV-16 continua a ser o único tipo de HPV que é classificado como causador de cancro da cabeça e pescoço.¹⁰ Além disso, há um espectro mais variado de outros tipos de HPV de alto risco com um papel menos importante e um comportamento diferente do HPV-16.¹¹⁻¹³ Destes, o HPV-33, HPV-35, HPV-45 e HPV-58 foram detetados, embora que menos frequentemente, representando 10-15% dos carcinomas da orofaringe HPV(+).¹¹⁻¹²

Portanto, os carcinomas espinhocelulares da orofaringe HPV(+) pertencem a uma entidade clínica e molecular distinta, com uma associação menos relevante com o tabaco e com o álcool. Vários estudos apontam que cerca de 60% dos tumores espinhocelulares da orofaringe são HPV positivos.¹³ Tem-se demonstrado que a presença de DNA de HPV em fragmentos de tecido neoplásico está estreitamente associada a uma má diferenciação tumoral, a metastização ganglionar e a estadios avançados da doença, todos eles marcadores de pior prognóstico.^{14,15} Contudo, estudos indicam, que apesar da doença ser frequentemente diagnosticada numa fase avançada da doença, o pior prognóstico, estes doentes parecem responder melhor à quimioterapia e

radioterapia do que os doentes HPV-negativos.^{14,15}

Pretende-se avaliar a prevalência do papiloma vírus humano nos tumores da cabeça e pescoço em doentes sem os fatores de risco álcool e tabaco associados.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo observacional, transversal, retrospectivo, descritivo e analítico. Identificaram-se todos os doentes com diagnóstico histológico de tumor da cabeça e pescoço, tratados entre 2010 e 2013 e analisou-se individualmente todos os processos clínicos. Foram excluídos todos os doentes com hábitos alcoólicos e tabágicos pesados assim como fatores de risco sexuais promíscuos. A presença de DNA do papiloma virus humano (HPV) foi testada nos blocos de tecidos tumorais embebidos em parafina por PCR (Polymerase Chain Reaction) utilizando os "primers" GP5+e GP6+.

RESULTADOS

Foram avaliados 44 doentes com uma média de idades de 61.4 anos (34-88). 47,7% eram do sexo masculino e 52,3% do sexo feminino. 95,5% dos doentes apresentavam diagnóstico histológico de carcinoma espinhocelular, 2,2% de adenocarcinoma e 2,2% outro tipo histológico. Aquando do diagnóstico 11,4% apresentava-se em estadio I, 25% em estadio II, 43,2% em estadio III e 20,5% em estadio IV. Relativamente à localização anatómica da nossa amostra: 70,6% na cavidade oral, 13,6% na laringe, 4,5% na orofaringe e outras localizações 11,3%.

Na nossa amostra encontramos um total de 13,6% (n=6) de casos DNA - HPV positivo, com uma média de idades de 63 anos (40-72): 2 casos HPV 16 em doentes do sexo masculino com tumores espinhocelulares da cavidade oral, e da laringe, 1 caso HPV 31 num doente do sexo feminino com tumor espinhocelular da cavidade oral, 1 caso HPV 42 num doente do sexo masculino com tumor espinhocelular da cavidade oral, 1 caso HPV 81 num doente do sexo masculino com tumor espinhocelular da laringe e 1 caso HPV 35 num doente do sexo masculino com tumor espinhocelular da orofaringe. 66,7% dos doentes foram submetidos a tratamento cirúrgico e 83,3% terapêutica sistémica e radioterapia.

No grupo dos doentes DNA-HPV positivos, 33,3% apresentavam um estadio I, 16,7% um estadio III e 50,0% um estadio IV A. Os doentes não admitiram comportamentos sexuais promíscuos. Do inquérito efetuado todos os doentes admitiram a prática de sexo oral.

A sobrevivência global da nossa população aos 12 meses e aos 60 meses foi de 90,1% e 20,5%, respetivamente. Ao analisarmos a sobrevivência global dos doentes DNA-HPV positivos deparamo-nos com uma sobrevivência aos 12 meses e aos 60 meses de 100% e 50% respetivamente.

TABELA 1

Características dos doentes e da doença

	Doentes HPV (-)	Doentes HPV (+)	Total
Número de doentes	38 (86,4%)	6 (13,6%)	44 (100%)
Sexo			
-Masculino	16 (42,1%)	5 (83,4%)	21 (47,7%)
-Feminino	22 (57,9%)	1 (16,6%)	23 (52,3%)
Idade (anos)	59,7 (34-88)	63 (40-72)	61.4 (34-88)
Histologia			
-Carcinoma espinhocelular	36 (94,8%)	6 (%)	42(95,5%)
-Adenocarcinoma	1 (2,6%)	0 (0,0%)	1 (2,2%)
-Outro tipo histológico	1 (2,6%)	0 (0,0%)	1 (2,2%)
Localização primária			
-Cavidade oral	27 (71,1%)	4 (66,6%)	31 (70,6%)
-Laringe	5 (13,2%)	1 (16,7%)	6 (13,6%)
-Orofaringe	1 (2,5%)	1 (16,7%)	2 (4,5%)
-Outras localizações	5 (13,2%)	0 (0,0%)	5 (11,3%)
Estadio da doença			
-Estadio I	10 (26,3%)	2 (33,3%)	12 (11,4%)
-Estadio II	9 (23,7%)	0 (0,0%)	9 (25%)
-Estadio III	5 (13,2%)	1 (16,7%)	6 (43,2%)
-Estadio IV	14 (36,8%)	3 (50,0%)	17 (20,5%)
Terapêutica			
-Cirurgia	30 (78,9%)	4 (66,7%)	34 (77,3%)
-Quimioterapia	21 (55,3%)	5 (83,3%)	26 (59,1%)
-Radioterapia	21 (55,3%)	5 (83,3%)	31 (70,5%)
Sobrevivência global			
-12 meses	33 (86,8%)	6 (100%)	39 (90,1%)
-60 meses	6 (15,8%)	3 (50%)	9 (20,5%)

DISCUSSÃO

O carcinoma espinhocelular da cabeça e pescoço (CECP) é composto por duas entidades clínicas distintas: CECP-HPV (+) e CECP-HPV (-). Efetivamente, a biologia de cancro da orofaringe HPV (+) distingue-se pela degradação de P53, inactivação da via do retinoblastoma RB e regulação positiva de P16.^{16,17} No entanto, o cancro da orofaringe secundário ao consumo do tabaco é caracterizado por mutação de TP53 e regulação negativa de CDKN2A (que codifica P16).^{16,17} Assim, aparentemente, os tumores da orofaringe HPV (+), devem ser considerados uma entidade clínica e patológica distinta. A incidência de tumores HPV (+) está a aumentar mas continua a existir uma falta de estudos nesta área.

É necessária uma maior compreensão da carcinogénese induzida pelo HPV – incluindo a complexa interacção entre a infecção por HPV e vias genéticas e moleculares. As mutações de TP53,¹⁸ a expressão aberrante de BCL2,¹⁹ a sobreexpressão do EGFR 20 e outros distúrbios podem agir, individualmente ou em conjunto, para modular o efeito prognóstico da deteção do HPV. É, portanto, necessário um perfil mais aprofundado dos biomarcadores, juntamente com a análise de HPV.² Além disso, a constatação das respostas terapêuticas se poderem correlacionar com o número de cópias do HPV,

sugere um papel futuro para a medição quantitativa da carga viral.²⁰

O HPV 6 e 11 são os subtipos virais mais frequentemente associados a lesões benignas, enquanto o HPV 16 e 18 está relacionado com lesões pré-malignas e malignas, tais como os carcinomas da orofaringe.⁴ Acredita-se que a presença de infecção por HPV 16 e 18 na base da língua pode aumentar 3 a 5 vezes o risco de desenvolver carcinoma.⁴ No nosso estudo o DNA do HPV foi detetado em 13,6% de doentes com carcinoma da cabeça e pescoço, maioritariamente com localização na cavidade oral. (50,0%). De 1980 a 2002, vários estudos concluíram que 12,4% dos carcinomas eram HPV (+), percentagem esta semelhante à obtida no nosso estudo.⁴ Alguns estudos detetaram DNA HPV, tanto na lesão primária, como na metastização cervical.⁴

Vários estudos reportam que o HPV status é o mais forte preditor de controlo de doença loco-regional e de sobrevivência global. De facto, a melhoria do prognóstico apresentada e a resposta ao tratamento com quimioterapia e radioterapia em tumores HPV (+),^{14,15} sugere que a deteção do tipo de HPV possa ser necessária para planear e individualizar os regimes terapêuticos de cada doente.²¹ Uma meta-análise de 37 estudos que analisou carcinoma da cabeça e pescoço

e infeções por HPV desde o ano de 2007, verificou que os carcinomas espinhocelulares da orofaringe HPV (+), em particular, apresentavam uma redução de 28% no risco de morte e uma diminuição de 49% na falência no tratamento comparativamente aos doentes HPV (-), tendência que se verifica na nossa amostra.³ Os estudos TAX 324 de fase III e o ECOG de fase II compararam a resposta ao tratamento assim como a falência deste em doentes HPV (+) e HPV (-).³ Em ambos os estudos verificaram-se sobrevivências globais maiores nos doentes HPV (+) comparativamente aos doentes HPV (-) e menores percentagens de persistência de doença nos tumores HPV (+) relativamente aos tumores HPV (-).³ Esta tendência também se verificou na nossa amostra com uma sobrevivência global nos doentes HPV (+) aos 12 e 60 meses de 100% e 50%, respetivamente. Vários estudos atribuem a sensibilidade aumentada à quimioterapia e à radioterapia à ausência de exposição ao tabaco e à presença não mutada de TP53 funcional.²² O aumento da sobrevivência de doentes com cancro HPV (+) também pode ser atribuível em parte à ausência de processo carcinogénico relacionado com o tabaco e a ingestão de álcool.²³ Tumores HPV (+) são mais sensíveis à quimioterapia citotóxica e à apoptose induzida por danos no DNA, secundária à incorporação da oncoproteínas virais E6 e E7.²⁴ Estes dados indicam claramente que a exposição ao tabaco altera a biologia dos tumores orofaríngeos HPV (+) e é um importante fator de prognóstico.²

As mudanças nas práticas sexuais são outras potenciais causas para o aumento dos carcinomas da orofaringe HPV (+).³ A transmissão do HPV ocorre sobretudo através do contato sexual direto, maioritariamente durante a relação sexual vaginal ou anal, porém pode também ocorrer durante a prática de sexo oral.³ A população portuguesa relata o seu primeiro contato sexual numa idade cada vez mais jovem, apresentando um maior número de parceiros sexuais e uma maior prática de sexo oral.²⁵ Dois estudos realizados nos Estados Unidos confirmaram que o aumento da promiscuidade sexual, tais como elevado número de parceiros sexuais, está associado a um maior risco de infeção oral por HPV-16 e consequentemente a um maior risco de carcinoma da orofaringe por HPV.³ Efetivamente, na nossa amostra apesar de nenhum doente referir comportamentos sexuais promíscuos, todos os doentes com carcinoma da orofaringe e cavidade oral HPV (+) admitiram a prática de sexo oral.

É necessário investigar e entender porque razão a doença surge predominantemente em homens, o que também se constata na nossa amostra, e se a história natural da infeção oral por HPV difere entre géneros. Melhores testes serão necessários para o diagnóstico do HPV e o uso do número de cópias de HPV DNA para o prognóstico e recidiva precoce precisa de ser analisado. Estratégias de prevenção primária e secundária devem ser avaliadas, incluindo o uso de vacinas de HPV contra

a infeção e vacinas terapêuticas como tratamento adjuvante na recidiva loco-regional e metastática da doença. Desde outubro de 2008 que a vacina por HPV faz parte do Programa Nacional de Vacinação (PNV), porém apenas nos indivíduos do sexo feminino. À medida que mais e mais informação sobre o papel da infeção por HPV nas doenças não-genitais vai surgindo, questiona-se se as vacinas profiláticas contra o HPV irão prevenir eficazmente estas patologias.²⁶ Efetivamente, as vacinas foram destinadas às lesões genitais relacionadas com o HPV, e desconhecia-se o impacto destas nas lesões da orofaringe associadas ao HPV.²⁶ Assim e apesar da aprovação da vacinação do HPV na prevenção do cancro do colo do útero e outras lesões ano-genitais, embora que apenas nas raparigas, esta ainda não se recomenda na prevenção do cancro da orofaringe, embora se tenha demonstrado ser altamente eficaz contra as estirpes de HPV mais frequentemente encontradas na orofaringe.²⁶

CONCLUSÃO

Na nossa população estudada, 13,6% dos doentes apresentaram positividade para DNA – HPV, o que é comparável com estudos publicados recentemente que evidenciam uma prevalência entre os 13-16% na população não fumadora e sem hábitos etílicos. Neste momento é mandatário a identificação/estratificação deste subtipo de doentes. Assume-se como prevalente a identificação de outros biomarcadores que permitam estratégias eficazes de quimioprevenção e consequente otimização do tratamento oncológico.

Proteção de pessoas e animais

Os autores declaram que os procedimentos seguidos estavam de acordo com os regulamentos estabelecidos pelos responsáveis da Comissão de Investigação Clínica e Ética e de acordo com a Declaração de Helsínquia da Associação Médica Mundial.

Confidencialidade dos dados

Os autores declaram ter seguido os protocolos do seu centro de trabalho acerca da publicação dos dados de doentes.

Conflito de interesses

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

Fontes de financiamento

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

Referências Bibliográficas

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74–108.
2. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA (2010) HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* 11: 781–89.
3. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, et al. (2008) Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 26: 612-619

4. Mendenhall WM, Werming JW, Pflister DG (2008) Cancer of Head and Neck: Treatment of Head and Neck Cancers. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 8th ed. (DeVita, VT, Lawrence, ST & Rosenberg, SA, eds.), pp809–77. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins.
5. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. (2007) Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 356: 1944–56.
6. Al-Awadhi R, Chehadeh W, Kapila K (2011) Prevalence of human papillomavirus among women with normal cervical cytology in Kuwait. *J Med Virol*. 83(3): 453–460.
7. World Health Organization (2007) IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: volume 90 - Human Papillomaviruses. Lyon: International Agency for Research on Cancer.
8. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC (2005) Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20–44 years. *Cancer* 103: 1843–49.
9. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. (2003) Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 348: 518–27.
10. Bouvard V, Baan R, Straif K, et al (2009) A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* 10:321–322.
11. Glombitza F, Guntinas-Lichius O, Petersen I (2010) HPV status in head and neck tumors. *Pathology – Research and Practice* 206:229–234.
12. Deng Z, Hasegawa M, Yamashita Y, et al (2012) Prognostic value of human papillomavirus and squamous cell carcinoma antigen in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 103:2127–2134
13. Mehanna H, Jones TM, Gregoire V, et al (2012) Oropharyngeal carcinoma related to human papillomavirus. *Bmj*. 340:c1439
14. Kumar B et al (2007) Response to therapy and outcomes in oropharyngeal cancer are associated with biomarkers including human papillomavirus, epidermal growth factor receptor, gender, and smoking. *Int J Radiat Oncol Phys* 69:109–111
15. Weinberger PM et al (2006) Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 24:5736–747
16. Efeyan A, Serrano (2007) M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell Cycle* 6:1006–1010.
17. Lee D, Kwon JH, Kim EH, et al (2010) HMGB2 stabilizes p53 by interfering with E6/E6AP-mediated p53 degradation in human papillomavirus-positive HeLa cells. *Cancer Lett* 292:125–132.
18. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, et al (2008) Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 14: 366–69.
19. Michaud WA, Nichols AC, Mroz EA, et al. (2009) Bcl-2 blocks cisplatin-induced apoptosis and predicts poor outcome following chemoradiation treatment in advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 15: 1645–54.
20. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, et al. (2008) EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 26: 3128–37.
21. Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, et al. (2009). HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head neck oncology* 1(1): 36.
22. Butz K, Geisen C, Ullmann A, et al (1996) Cellular responses of HPV-positive cancer cells to genotoxic anti-cancer agents: repression of E6/E7- oncogene expression and induction of apoptosis. *Int J Cancer* 68: 506–13.
23. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. (2000) Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 92: 709–20.
24. Liu Y, McKalip A, Herman B (2000) Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation. *J Cell Biochem* 78: 334–49.
25. Reis M*, Ramiro L, Matos M et al. (2012) Os comportamentos sexuais dos universitários portugueses de ambos os sexos em 2010. *Rev Port saúde pública* 30(2):105–114.
26. Wierzbicka M, Józefiak A, Jackowska J, et al. (2014) HPV vaccination in head and neck HPV-related pathologies. *Otolaryngol Pol* 68 (4):157-173.