



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Ensino e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



**ENVOLVIMENTO DE VIAS HORMONAIS EM LESÕES
TUMORAIS DE CABEÇA E PESCOÇO: UMA COMPARAÇÃO
ENTRE ANIMAIS MACHOS E FÊMEAS TRANSGÊNICOS
PARA HPV16**

CLARIANO PIRES DE OLIVEIRA NETO

São Luís – MA
2020

CLARIANO PIRES DE OLIVEIRA NETO

**ENVOLVIMENTO DE VIAS HORMONAIS EM LESÕES
TUMORAIS DE CABEÇA E PESCOÇO: UMA COMPARAÇÃO
ENTRE ANIMAIS MACHOS E FÊMEAS TRANSGÊNICOS
PARA HPV16**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto.

Linha de Pesquisa: Câncer e HPV.

Orientadora: Prof^ª Dra^a Luciane Maria Oliveira Brito.

Co-orientadora: Prof^ª Dr^a Haissa Oliveira Brito.

Coordenadora: Prof^ª Dr^a Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento.

São Luis – MA
2020

Oliveira Neto, Clariano Pires

Envolvimento de vias hormonais em lesões tumorais de cabeça e pescoço: uma comparação entre animais machos e fêmeas transgênicos para HPV16 / Clariano Pires de Oliveira Neto – 2020.

84f.

Coorientadora: Haissa Oliveira Brito.

Orientadora: Luciane Maria Oliveira Brito.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Saúde do Adulto/CCBS, Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA, 2020.

1. Câncer de cabeça e pescoço. 2. HPV. 3. Receptor de estrogênio α . 4. Receptor de estrogênio β . I. Brito, Haissa Oliveira. II. Brito, Luciane Maria Oliveira

CDU: 616.001/009

CLARIANO PIRES DE OLIVEIRA NETO

**ENVOLVIMENTO DE VIAS HORMONAIS EM LESÕES
TUMORAIS DE CABEÇA E PESCOÇO: UMA COMPARAÇÃO
ENTRE ANIMAIS MACHOS E FÊMEAS TRANSGÊNICOS PARA
HPV16**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Saúde do
Adulto da Universidade Federal do Maranhão
para obtenção do Título de Mestre em Saúde do
Adulto.

A Banca Examinadora de Defesa de Mestrado, em sessão pública, considerou o
candidato apto em 13 /11 / 2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Luciane Maria Oliveira Brito (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Haissa Oliveira Brito (Co-Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Margarida Maria Monteiro da Silva Bastos (Examinadora)
Universidade do Porto

Profa. Dr. Rui Miguel Gil da Costa Oliveira (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Fernanda Ferreira Lopes (Examinadora)
Universidade Federal do Maranhão

Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartagenes (Suplente)
Universidade Federal do Maranhão

AGRADECIMENTOS

A Deus por tanta generosidade comigo.

A minha família por sempre me apoiar.

A minha orientadora, Profa. Dra. Luciane Brito, pela amizade e confiança que tem em mim. A Profa. Dra. Haissa Brito e ao Prof. Dr. Rui Miguel Gil da Costa pela oportunidade da pesquisa experimental e todos os ensinamentos adquiridos ao longo dessa pesquisa.

A Dra Margarida Bastos da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto pela cedência dos animais. A Dra Paula Oliveira e as mestrandas Beatriz Medeiros-Fonseca e Verônica Mestre pelo trabalho realizado na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, fundamental para execução dessa pesquisa. Ao professor Rui Medeiros e ao mestre Diogo Estevão pela genotipagem dos animais no Instituto Português de Oncologia.

Ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e à Universidade Federal do Maranhão pela minha formação, desde a graduação e agora na pós-graduação, em especial à Profa. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento, que coordena o programa com demasiada maestria e competência.

Ao Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão pela permissão de utilização do espaço físico para o desenvolvimento da pesquisa e reuniões científicas necessárias para a construção desta dissertação. Ao grupo de estudos “Professora Luciane Brito”, pela possibilidade de crescimento no meio científico, em especial a Jucileide Mota, sempre presente para ajudar no que for necessário.

Aos colegas de mestrado com quem compartilhei as alegrias e angústias da pós graduação.

RESUMO

Introdução: O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é o quinto câncer mais comum no mundo. O papilomavírus humano (HPV) é um importante fator de risco para essa neoplasia. Receptores hormonais têm sido implicados na patogênese de diversos tumores. Estudos com animais são úteis para reproduzir processos biológicos em ambientes controlados. O objetivo desse estudo foi determinar o *status* dos receptores de estrogênio alfa e beta e de metaloproteinase-2 (MMP-2) no CCP em camundongos transgênicos para HPV16.

Métodos: Foram estudadas 289 amostras de cabeça e pescoço provenientes de 149 camundongos (67 machos e 82 fêmeas) transgênicos K14-HPV16 e 20 camundongos selvagens (10 machos e 10 fêmeas). Os animais foram acondicionados na Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) e as amostras enviadas ao Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA) para análise histológica com coloração em Hematoxilina e Eosina e Picrosirius, e imunohistoquímica para receptor de estrogênio alfa (RE α), receptor de estrogênio beta (RE β), receptor de progesterona (RP) e MMP-2. A expressão de RE α , RE β , RP e MMP-2 foi quantificada utilizando o produto entre a porcentagem de células marcadas e a intensidade da marcação (escore H). Os dados foram analisados usando o programa GraphPad Prism para identificar diferenças estatísticas entre machos e fêmeas.

Resultados: As lesões malignas estavam presentes em 23,1% das fêmeas e 4,5% dos machos ($p = 0,0071$). Quanto a localização das lesões, estas se localizaram quase que exclusivamente na língua, sobretudo na base da língua, porém só foi verificada diferença estatisticamente significativa nas fêmeas ($p = 0,0003$). A rede de colágeno foi considerada aumentada em 77,8% das amostras de fêmeas e normal em todas as amostras de machos ($p = 0,0307$). Não houve expressão de RP nas amostras estudadas. Os tumores de machos não tiveram expressão para receptores de estrogênio. Nas fêmeas houve 71% de positividade para RE α , 43% de positividade para RE β e 66% de positividade para MMP-2. O escore H foi estatisticamente significativo em lesões intraepiteliais para MMP-2 ($p = 0,0151$), no estroma de lesões intraepiteliais para RE α e RE β ($p = 0,0005$) e no estroma tumoral para RE α ($p = 0,0278$).

Conclusão: Verificou-se a presença de RE α no estroma de lesões pré-malignas e malignas de cabeça e pescoço em fêmeas transgênicas. Não houve significância estatística na expressão de receptores de estrogênio nos tumores. Houve uma correlação moderada entre a expressão de RE α e MMP-2 em lesões intraepiteliais e tumorais de cabeça e pescoço. Esses achados sugerem que a ação do receptor pode se dar no microambiente em que o tumor se encontra. A expressão de receptores hormonais pode ter valor prognóstico e terapêutica, no entanto mais estudos são necessários.

Palavras-chave: Câncer de Cabeça e Pescoço; HPV; Receptor de Estrogênio α ; Receptor de Estrogênio β

ABSTRACT

Background: Head and neck cancer (HNC) is the fifth most common cancer in the world. Human papillomavirus (HPV) is an important risk factor for this neoplasm. Hormonal receptors have been implicated in the pathogenesis of several tumors. Animal studies are useful for reproducing biological processes in controlled environments. The aim of this study was to determine the status of alpha and beta estrogen and metalloproteinase-2 (MMP-2) receptors in the CCP in HPV16 transgenic mice.

Methods: 289 head and neck samples from 149 K14-HPV16 transgenic mice (67 males and 82 females) and 20 wild mice (10 males and 10 females) were studied. The animals were packaged at the University de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD) and the samples sent to the Tumor and DNA Bank of Maranhão (BTMA) for histological analysis with Hematoxylin and Eosin and Picrosirius staining, and immunohistochemistry for receptor of alpha estrogen (ER α), estrogen beta receptor (ER β), progesterone receptor (PR) and MMP-2. The expression of ER α , ER β , PR and MMP-2 was quantified using the product between the percentage of marked cells and the intensity of the marking (H score). The data were analyzed using the GraphPad Prism program to identify statistical differences between males and females.

Results: Malignant lesions were present in 23.1% of females and 4.5% of males ($p = 0.0071$). As for the location of the lesions, they were located almost exclusively on the tongue, especially at the base of the tongue, but only a statistically significant difference was found in the females ($p = 0.0003$). The collagen distribution was considered increased in 77.8% of the female samples and normal in all the male samples ($p = 0.0307$). There was no expression of RP in the studied samples. Male tumors had no expression for estrogen receptors. In females there was 71% positivity for ER α , 43% positivity for ER β and 66% positivity for MMP-2. The H score was statistically significant in intraepithelial lesions for MMP-2 ($p = 0.0151$), in the stroma of intraepithelial lesions for ER α and ER β ($p = 0.0005$) and in the tumor stroma for ER α ($p = 0.0278$).

Conclusion: The presence of ER α in the stroma of pre-malignants and malignant lesions of the head and neck was verified in transgenic females. There was no statistical significance in the expression of estrogen receptors in tumors. There was a moderate correlation between the expression of ER α and MMP-2 in intraepithelial and tumor lesions of the head and neck. These findings suggest that the receptor's action may occur in the microenvironment in which the tumor is located. The expression of hormone receptors can have prognostic and therapeutic value, however more studies are needed.

Keywords: Head and Neck Cancer; HPV; Estrogen Receptor α ; Estrogen Receptor β

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Localização dos cânceres de cabeça e pescoço	14
Figura 2: Genoma do papilomavírus humano tipo 16 (HPV16)	18
Figura 3: Vias de sinalização das oncoproteínas do HPV de alto risco	20
Figura 4: Receptores de estrogênio no câncer	22
Figura 5: Mecanismo de ação das terapias anti-hormonais	23
Figura 6: Padrão de coloração com Hematoxilina/Eosina de tecidos de cabeça e pescoço em diferentes estágios da carcinogênese	33
Tabela 1: Avaliação histológica quanto à natureza patológica das amostras de cabeça e pescoço de machos e fêmeas HPV positivo e HPV negativo	34
Tabela 2: Caracterização das lesões de cabeça e pescoço quanto ao sítio de localização em camundongos machos e fêmeas HPV positivo	34
Figura 7: Coloração histoquímica pelo picrossírius em tecidos de camundongos	35
Tabela 3: Caracterização da rede de colágeno segundo a coloração por Picrosirius em lesões de cabeça e pescoço camundongos machos e fêmeas HPV positivo	35
Figura 8: Imunohistoquímica para detecção dos receptores de estrogênio alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) em mucosa oral normal de camundongos	36
Figura 9: Imunohistoquímica para detecção dos receptores de estrogênio alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) na papila circunvalada lingual de camundongos	37
Figura 10: Imunohistoquímica para detecção dos receptores de estrogênio alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) em lesões intraepiteliais orais de camundongos transgênicos para o HPV16	37
Figura 11: Imunohistoquímica para detecção dos receptores de estrogênio alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) em carcinomas escamosos orais de camundongos transgênicos para o HPV16	38
Figura 12: Imunohistoquímica para detecção do receptor de progesterona em tecidos de camundongos	39

Figura 13: Escore H da expressão de RE α de lesões malignas e pré-malignas e seus respectivos estromas em amostras de cabeça e pescoço de animais transgênicos para HPV16	40
Figura 14: Escore H da expressão de RE β de lesões malignas e pré-malignas e seus respectivos estromas em amostras de cabeça e pescoço de animais transgênicos para HPV16	40
Tabela 4: Escore H da expressão de MMP-2 de lesões malignas e pré-malignas e seus respectivos estromas em amostras de cabeça e pescoço de animais transgênicos para HPV16	41
Figura 15: Imunohistoquímica para detecção de metaloproteinase-2 em tecidos de camundogos	42

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BTMA	Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão
CCP	Câncer de Cabeça e Pescoço
GPÉR	Receptor de Estrogênio Acoplado à Proteína G
H&E	Hematoxilina e Eosina
HPV	Papilomavírus Humano
IARC	Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
IHQ	Imunohistoquímica
INHANCE	Consórcio Internacional sobre Epidemiologia do Câncer de Cabeça e Pescoço
MMP	Metaloproteinase da Matriz
OMS	Organização Mundial da Saúde
RA	Receptor de Androgênio
RE	Receptor de Estrogênio
REα	Receptor de Estrogênio Alfa
REβ	Receptor de Estrogênio Beta
RP	Receptor de Progesterona
UTAD	Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

SUMÁRIO

1	Introdução	12
2	Referencial Teórico	14
2.1	Câncer de Cabeça e Pescoço	14
2.1.1	Câncer de Cabeça e Pescoço Não Relacionado ao HPV	16
2.1.2	Câncer de Cabeça e Pescoço Relacionado ao HPV	17
2.2	Carcinogênese Relacionada ao HPV	18
2.3	Receptores de Hormônios Sexuais	20
2.4	Hormônios e Cânceres	23
2.4.1	Hormônios nos Cânceres de Cabeça e Pescoço	24
2.5	Estudos com Modelos Animais	25
3	Objetivos	26
4	Resultados	27
4.1	Artigo Original	27
4.2	Artigo de Revisão	55
	Referências	76
	Anexo	83
	Aprovação no Comitê de Ética	84

1. INTRODUÇÃO

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) é a infecção sexualmente transmissível mais comum no mundo. Seu papel na carcinogênese foi confirmado em 1983 por Durst e colaboradores que verificaram a relação entre o HPV 16 e o carcinoma cervical (1). Desde então, diversos sítios de acometimento têm sido atribuídos à infecção pelo HPV, incluindo malignidades na vagina, vulva, pênis, anus e orofaringe (2).

Muitos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (CCP), principalmente aqueles localizados na base da língua e nas tonsilas, não apresentam os fatores de risco tradicionalmente ligados à neoplasia (ex. tabagismo, alcoolismo), e etiológicamente têm sido verificado a presença de HPV, especialmente o subtipo 16, nesses espécimes tumorais (3). Em 2007 a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) reconheceu o HPV como fator de risco para a carcinogênese orofaríngea (4).

Mudanças no comportamento sexual, tais como aumento da prevalência de sexo oral e do número de parceiros, são consistentemente relacionadas ao aumento de CCP relacionada ao HPV (5, 6).

Além da diferença etiológica, os CCP relacionados ao HPV também se diferenciam dos não relacionados ao HPV quanto ao prognóstico, apresentando uma melhor sobrevida e a necessidade de tratamentos menos agressivos, motivo pelo qual, atualmente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o CCP em duas entidades diferentes: CCP relacionados ao HPV e CCP não relacionados ao HPV (7).

No subgrupo de CCP relacionados ao HPV se nota uma predileção pelo sexo masculino em uma razão de 4:1 (8). Embora parte dessa diferença possa ser atribuída

aos hábitos de vida e comportamento sexual, outros fatores parecem estar associados à essa maior ocorrência em homens, tal como a expressão de receptores hormonais.

Os hormônios desempenham papel importante em diversos tipos de cânceres (ex. mama, endométrio, próstata), sendo a hormonioterapia uma das modalidades terapêuticas para essas neoplasias (9). Diversos estudos tentaram determinar participação dos hormônios sexuais nos CCP, com resultados ainda inconclusivos (10-14).

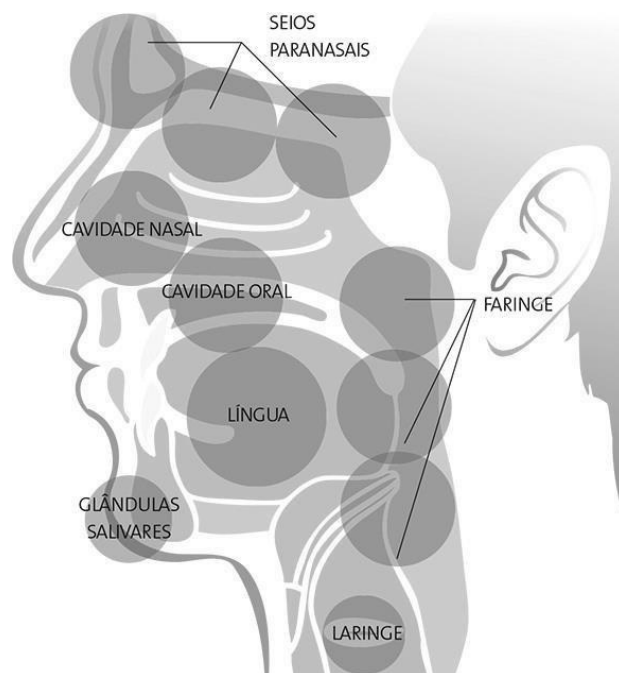
Em nosso grupo de pesquisa, verificamos que animais fêmeas transgênicos para HPV16 apresentam maior prevalência de lesões sugestivas de tumor que animais machos (dados não publicados). Esse achado nos faz pensar se nas neoplasias de fundo escamoso tais como as produzidas por HPV, há uma influência hormonal que possibilite uma maior expressão no sexo feminino que no masculino.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer de Cabeça e Pescoço

O CCP, por definição, compreende um grupo heterogêneo de doenças malignas que se desenvolvem acima da caixa torácica e abaixo da base do crânio. Afetam uma variedade de sítios, incluindo pele, cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe, laringe, seios paranasais, e glândulas salivares (Figura 1). Apesar da doença de origem epitelial, chamada carcinoma escamoso, ser mais comum, neoplasias mesenquimais, neurais e de outras células também podem ocorrer (15).

Figura 1: Localização dos cânceres de cabeça e pescoço



Disponível em: <https://vivasaude.digisa.com.br/>

Anualmente são mais de 650 mil novos casos e 330 mil mortes em todo o mundo (16). Nos EUA, corresponde a 3% de todas as causas de câncer, com aproximadamente 53 mil norte-americanos desenvolvendo CCP anualmente e 10.800 mortes ao ano atribuídas à doença. Parece haver uma predileção pelo sexo masculino, numa razão que varia entre 2:1 e 4:1 (17).

O tabagismo e a ingestão de álcool são importantes fatores de risco, reconhecidos classicamente como causas do CCP (18). No entanto a infecção pelo HPV tem se mostrado um importante determinante para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas, permitindo a distinção de um subtipo com características clínico-patológicas diferenciadas (19). Outros fatores de risco incluem predisposição genética, exposição a substâncias tóxicas e dieta (20).

O câncer de orofaringe é o CCP mais comum. A incidência geral é de 11,2/100.000, no entanto homens são mais acometidos em uma razão de 16,9 novos casos para cada 100.000 pessoas, comparados a 6,2/100.000 em mulheres. Esses dados fazem com que essa neoplasia ocupe a 9ª posição dentre as mais diagnosticadas em homens, correspondendo a 4% de todos os novos diagnósticos de câncer. A sobrevida em 5 anos é estimada em 64,7% (8).

A incidência tem crescido nos últimos anos. Este aumento é associado ao aumento da prevalência da infecção oral pelo HPV. Entre 2005 e 2014, a incidência de doenças malignas relacionadas à infecção pelo HPV, principalmente em tonsilas, orofaringe, cavidade oral e língua tiveram um acréscimo de 3%, enquanto doenças malignas associadas com fatores de risco tradicionais para o CCP (como o tabagismo e ingestão de álcool) tiveram um decréscimo de 2%. No entanto, cânceres de orofaringe relacionados ao HPV são reconhecidamente mais sensíveis aos tratamentos que aqueles não relacionados, o que representa um aumento da incidência com uma queda na mortalidade (21).

2.1.1 Câncer de Cabeça e Pescoço Não Relacionado ao HPV

O tabagismo é a causa líder de mortes passíveis de prevenção e de mortes relacionadas ao câncer no mundo (22). Em relação ao CCP há relação causal direta com cânceres da cavidade oral, laringe e faringe (23). A IARC classifica o tabagismo como grupo 1 de carcinógenos, definido como agente com evidência suficiente para carcinogenicidade em humanos (24).

O risco de desenvolver CCP relacionado ao cigarro é fortemente dose dependente, no entanto existe ainda em quem faz uso de pequenas quantidades. Dados do Consórcio Internacional sobre Epidemiologia de Câncer de Cabeça e Pescoço (INHANCE) mostram que o uso de cigarros, em qualquer quantidade, aumenta o risco de desenvolver câncer de cabeça e pescoço em 50% e que esse risco mais que dobra quando o uso supera 5 cigarros diários (25).

A ingestão de álcool é outro fator de risco bem estabelecido para muitos cânceres de cabeça e pescoço, esôfago e estômago (26, 27). O álcool tem sido descrito como um carcinógeno do trato aero digestivo superior pelo IARC desde 1988, principalmente relacionado a cânceres da cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe (28). A suscetibilidade para o desenvolvimento de cânceres relacionados ao álcool também parece ter alguma associação a fatores genéticos, com alguns polimorfismos apresentando maior prevalência (29). É difícil isolar o papel do álcool do tabagismo, pois muitas vezes esses fatores coexistem, sendo um fator de confundimento nos cálculos estatísticos. O uso concomitante de álcool e tabaco confere um risco 35 vezes maior de CCP. Parece haver uma associação entre o número de doses com a ocorrência de CCP, em que a ingestão de 3 ou mais doses por dia dobra o risco de desenvolver este

tipo de câncer (30). As mulheres são mais suscetíveis aos efeitos carcinógenos do álcool que os homens (31).

2.1.2 Câncer de Cabeça e Pescoço Relacionado ao HPV

A ligação entre HPV e carcinoma de orofaringe foi primeiramente descrita por Gillison e colaboradores em 2000. Em seu estudo, foi identificado que 25% de todos os cânceres de cabeça e pescoço eram positivos para HPV e quando avaliados os cânceres de tonsilas e base da língua, esse número subia para 62%. O sorotipo mais comum foi o HPV16, presente em 90% dos cânceres positivos para HPV. Também foram notadas importantes diferenças entre os tumores relacionados ao HPV e os não relacionados, em que os primeiros tiveram desfechos mais favoráveis (32).

Histologicamente, tumores relacionados ao HPV diferem dos não relacionados por apresentarem morfologia predominantemente não queratinizada (33). Os tumores HPV positivos estão mais associados à presença de linfadenopatia cervical com degeneração cística, porém, diferentemente dos tumores HPV negativos, o acometimento nodal não confere um pior prognóstico (34). Essa diferença prognóstica ainda não é totalmente explicada. A principal hipótese é de que esteja relacionada a mutação na p53, a qual está geralmente presente no CCP associado ao tabagismo e ao etilismo e ausentes no CCP relacionado ao HPV, no qual as oncoproteínas virais promovem sua supressão (35).

Estudos já demonstraram a associação entre a infecção oral pelo HPV de alto risco com o desenvolvimento de CCP (36-38). O HPV16 tem sido o sorotipo mais fortemente associado. Um estudo multicêntrico mostrou que a presença de HPV16 na cavidade oral resultou em um risco aumentado de desenvolver CCP (37). A coexistência dos fatores infecção pelo HPV e tabagismo, também resulta em um risco aumentado

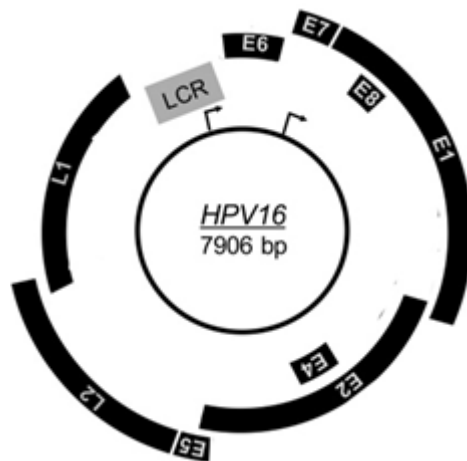
para CCP quase que duplicado quando comparado a infecção pelo HPV em não fumantes (39).

2.2 Carcinogênese Relacionada ao HPV

O HPV é um vírus DNA de dupla-hélice que pertence à família *Papillomaviridae* que infecta humanos com tropismo por pele e mucosas (40). Caracteriza-se por apresentar simetria icosaédrica, não ser envelopado e conter 72 capsômeros formados por duas proteínas, L1 e L2 (41-43). É um vírus transmitido pelo contato direto que compreende mais de 200 sorotipos conhecidos, a grande maioria deles causando lesões epiteliais benignas (44). No entanto, certos sorotipos de HPV são conhecidos por promover carcinogênese, como os tipos 16, 18 e 31, envolvidos no desenvolvimento de câncer anogenital e de orofaringe (45). De acordo com dados norte americanos, a prevalência da infecção pelo HPV gira em torno de 32,9% a 53,8%, com um pico de prevalência entre os 20 e 24 anos, configurando a mais comum infecção sexualmente transmissível conhecida (46).

Seu genoma codifica proteínas relacionadas a formação do capsídeo viral (L1-L2), replicação e transcrição gênica (E1, E2, E4 e E5) e transformação tumoral (E6 e E7) por meio da supressão da p53 e da proteína retinoblastoma (pRB) (47) (Figura 2).

Figura 2: Genoma do papilomavírus humano tipo 16 (HPV16)



Adaptado de Mallory et al., 2017 (47)

Por ser um vírus que não provoca uma reação imune imediata no hospedeiro, estima-se que pelo menos 75% da população terá contato com o HPV em algum momento da vida (40). Contudo, na maioria dos casos a infecção é transitória, podendo ocorrer eliminação espontânea do vírus em 90% dos casos dentro de 6-18 meses (48). Mesmo existindo essa eliminação espontânea, algumas infecções com alto risco ou por tipos oncogênicos do HPV irão evoluir para câncer de colo do útero, vulva, vagina, ânus, pênis, orofaringe, e/ou câncer na cavidade oral (49, 50). A carcinogênese relacionada ao HPV envolve a infecção dos queratinócitos na camada basal do epitélio escamoso e replicação em seus núcleos (51).

O processo pelo o qual o HPV influencia a formação de carcinomas ocorre através das alterações do ciclo celular por meio da expressão das proteínas E6 e E7, as quais inativam e eliminam os produtos de genes supressores de tumor (p53 e Rb). Tanto o p53 quanto o Rb atuam como um sensor de danos no DNA e auxiliam o sistema de reparo, no entanto o Rb atua no ponto de checagem mais inicial situado no G1, enquanto o p53 atua em um ponto diferente localizado no G2 (52, 53) (Figura 3). As lesões malignas associadas ao HPV 16 e 18 ocorrem devido ao fato, do DNA viral

resposta apropriada. Tais processos são mediados por receptores hormonais que se ligam aos hormônios especificamente e com alta afinidade (55).

Os receptores hormonais estão presentes na superfície celular ou no interior das células. Os receptores da superfície celular geralmente medeiam ações de hormônios polipeptídicos, catecolaminas e prostaglandinas, cujas ligações resultam na deflagração da sinalização do “segundo mensageiro”. Os hormônios que atuam no interior das células se ligam a um dos receptores pertencentes à superfamília de receptores que compreende mais de 100 membros diferentes. Estes receptores medeiam as ações dos hormônios esteroides, tireoidianos, retinoides e vários outros ligantes, atuando como fatores de transcrição regulados por ligantes (56).

As ações de andrógenos, como testosterona e di-hidrotestosterona, são mediadas pelo receptor de androgênio (RA), um fator de transcrição nuclear dependente de ligantes e membro da família de receptores nucleares de hormônio esteroide. Dada sua ampla expressão em muitas células e tecidos, a RA possui uma ampla gama de ações biológicas, incluindo papéis importantes no desenvolvimento e manutenção dos sistemas reprodutivo, musculoesquelético, cardiovascular, imunológico, neural e hemopoiético. A sinalização de RA também pode estar envolvida no desenvolvimento de tumores na próstata, bexiga, fígado, rim e pulmão (57).

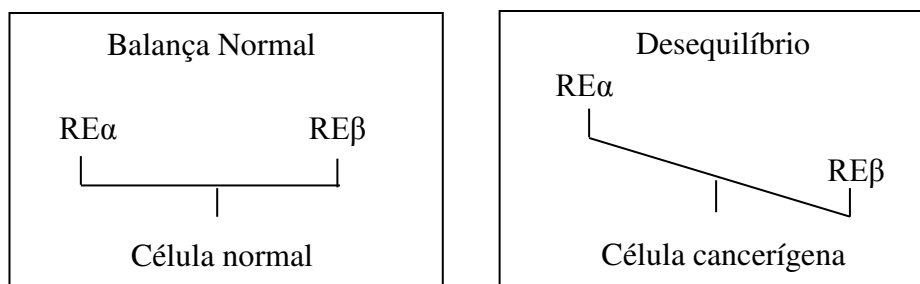
O receptor de progesterona (RP) é um dos principais reguladores dos tecidos reprodutivos femininos. Controla os processos de desenvolvimento e a proliferação e diferenciação durante o ciclo reprodutivo e a gravidez. O RP também desempenha um papel na progressão do câncer de mama hormônio dependente (58).

Os estrogênios influenciam muitos processos fisiológicos em mamíferos, incluindo, entre outros, reprodução, saúde cardiovascular, integridade óssea, cognição e

comportamento. Dado esse amplo papel do estrogênio na fisiologia humana, o estrogênio também está implicado no desenvolvimento ou progressão de inúmeras doenças, que incluem vários tipos de câncer (mama, ovário, colo retal, próstata, endométrio), osteoporose, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, resistência à insulina, lúpus eritematoso, endometriose e obesidade. Em muitas dessas doenças, o estrogênio medeia seus efeitos através do receptor de estrogênio (RE), que serve de base para muitas intervenções terapêuticas (59). Existem duas variantes de RE, alfa e beta (60). RE α e RE β são proteínas distintas codificadas por genes distintos (ESR1 e ESR2, respectivamente). RE α está localizado no cromossomo 6 e RE β está localizado no cromossomo 14, no entanto possuem uma sequência genômica bem semelhante e, como RE, funcionam como fatores de transcrição ativados por um ligante (estrogênio) (61).

A potência como promotor do crescimento tumoral relacionada ao estrogênio nos tecidos está bem estabelecida e é atribuída ao incremento da transcrição no ciclo celular via RE α . Por outro lado, o RE β apresenta função anti-proliferativa e esse antagonismo de forças coexiste para promoção da homeostase. Baseado nessa proposição sugere-se que o aumento da relação RE α / RE β possa ter algum papel no crescimento tumoral (61) (Figura 4).

Figura 4: Receptores de estrogênio no câncer



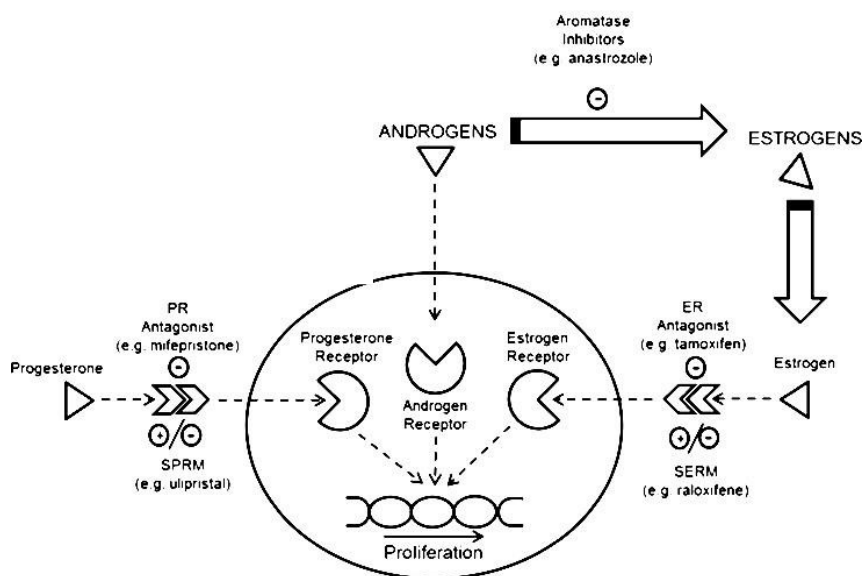
Adaptado de Munoz et al., 2015 (61)

2.4 Hormônios e Cânceres

A estimulação hormonal excessiva da proliferação celular aumenta o risco de mutação e subsequente proliferação de clones de células mutadas. Portanto, os hormônios são capazes de agir como agentes cancerígenos poderosos e são considerados um “agente cancerígeno” completo devido à sua capacidade de iniciar e promover o desenvolvimento de cânceres (9).

Os hormônios têm sido implicados na gênese de câncer de mama, próstata, uterino, ovário, testicular, tireoide e ossos (62). Foi demonstrado que o aumento da exposição aos hormônios estrogênio e progesterona nas mulheres aumenta o risco de câncer de mama (58). O início precoce da menstruação, a gravidez tardia, a obesidade, a menopausa tardia e o uso de contraceptivos orais aumentam a exposição do tecido mamário ao estrogênio, estimulando o aumento da proliferação (63). Da mesma forma, o hormônio sexual masculino testosterona tem sido implicado no desenvolvimento do câncer de próstata (64) (Figura 5).

Figura 5: Mecanismo de ação das terapias anti-hormonais



Adaptado de Munoz et al., 2015 (61)

2.4.1 Hormônios nos Cânceres de Cabeça e Pescoço

Estudos confirmam que há relação entre receptores de estrogênio e progesterona e risco de CCP em mulheres. As evidências indicam um efeito favorável, principalmente em mulheres jovens, as quais possuem biologicamente elevados níveis de estrogênio, o que estaria associado a um menor risco de CCP quando comparado aos homens (65).

O RE β , em particular, funciona como um supressor de tumor pela inibição da proliferação e diferenciação celular, e sua positividade em CCP é relacionada com melhor sobrevida dos pacientes (14). O papel protetivo do β está associado à correlação positiva com E-caderina e β -catetina nas junções celulares e negativa com o acréscimo no estadiamento TNM (66). No entanto, em casos selecionados, a terapia com tamoxifeno (um modulador do receptor de estrogênio) teve resultado satisfatório em pacientes selecionados (67).

Kano et al., em 2019, encontraram associação entre o RE α e CCP HPV positivo. Esses tumores também foram associados a um prognóstico favorável. RE α foi positivo em aproximadamente 45% dos tumores, sem predileção para sexo. O mecanismo proposto pelos autores é de que os valores elevados de RE α estão diretamente relacionados ao aumento da apolipoproteína APOBECA3, a qual facilita a integração do genoma viral ao genoma celular (13). Esses dados foram confirmados por Kwon et al. que determinaram o RE α presente em 35% das amostras estudadas e consideraram este um biomarcador de melhor sobrevida no CCP associado ao HPV (68).

Cânceres da cavidade oral, laringe e hipofaringe expressam RE α e RE β , assim como RP em 50% dos casos. Um receptor de hormônio sexual isolado é um evento raro, na maioria dos casos a expressão de RE α é associada à expressão de RP, sendo esse o

fenótipo mais encontrado. Esse achado pode sugerir comportamento semelhante ao de outros cânceres, como no câncer de mama. A localização do CCP parece não alterar esse fenótipo (12).

Um estudo recente de Mohamed et al. (2018) encontrou que a expressão de RA está associada com tumores de cabeça e pescoço invasivos relacionados ao HPV, já a expressão de RP está associada com tumores não relacionados ao HPV (10). Tumores que expressam RA estão associados a um maior risco de metástases e isso pode ser explicado pelo fato de que o RA desempenha papel importante na promoção da migração celular (69, 70).

2.5 Estudos com Modelos Animais

O camundongo é o organismo modelo mais comumente usado na pesquisa de doenças humanas (71). Modelos de camundongos têm sido usados extensivamente para fornecer informações sobre os mecanismos subjacentes a muitas doenças, para explorar a eficácia de medicamentos candidatos e para prever as respostas dos pacientes (72).

Para conseguir simular a genética e a histologia de tumores humanos, animais geneticamente modificados foram desenvolvidos. O uso de camundongos geneticamente modificados para avaliação da carcinogenicidade já tem mais de 20 anos. Especificamente para o estudo do HPV e a carcinogênese relacionada ao vírus, diversos modelos de engenharia genética já foram estabelecidos, para diversas finalidades. Um dos modelos mais utilizados é o K14HPV16, desenvolvido por Arbeit et al. em 1994 em que os genes *early* do HPV16 são expressos na camada basal de queratinócitos do animal (73). Este é um modelo útil para reproduzir o processo carcinogênico de múltiplos estágios que ocorre em doenças humanas e compartilha características histológicas semelhantes às dos seres humanos (74).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Analisar a expressão de receptores de estrogênio alfa e beta no CCP usando um modelo de animais transgênicos para HPV 16.

3.2 Específicos

- Analisar a morfologia do tecido através da histopatologia de tecidos de cabeça e pescoço de animais com HPV16 corados com Hematoxilina e Eosina e *Picrosirius*;
- Analisar a expressão de receptores estrogênicos alfa e beta e metaloproteinase-2, através de imunohistoquímica, em tecidos de cabeça e pescoço de animais com HPV16;
- Correlacionar os achados da histopatologia e imuno-histoquímica em ambas as amostras de animais machos e fêmeas transgênicos para HPV.
- Comparar o envolvimento de receptores de estrogênio e metaloproteinase-2 na fisiopatologia de tumores de cabeça e pescoço de animais machos e fêmeas transgênicos para HPV16.

4. RESULTADOS

4.1 Artigo Original

Expressão de receptores de estrogênio alfa e beta em lesões malignas e pré-malignas de cabeça e pescoço de um modelo animal para HPV16

(Revista International Journal of Cancer – **Qualis A1**)

Clariano Pires de Oliveira Neto¹, Verônica Mestre², Beatriz Medeiros-Fonseca², Paula Oliveira^{2,3}, Rui Medeiros^{4,5}, Margarida Bastos⁶, Haissa Oliveira Brito¹, Rui Miguel Gil da Costa^{1, 2, 4, 6}, Luciane Maria Oliveira Brito¹

Introdução

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é o quinto tipo de câncer mais comum no mundo (1). Apesar dos avanços diagnósticos e terapêuticos, ainda apresenta baixa sobrevida em 5 anos (2). Classicamente o tabagismo e o alcoolismo são apontados como os principais fatores de risco (3), no entanto, principalmente nos últimos anos, o papilomavírus humano (HPV) tem ganhado protagonismo na carcinogênese do CCP, principalmente nos países desenvolvidos, com cerca de 50-70% das lesões tumorais associadas à infecção pelo vírus no Japão, Estados Unidos e Europa (4-8).

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto, Universidade Federal do Maranhão – UFMA, São Luís, Brasil

²CITAB, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - UTAD, Vila Real, Portugal

³Departamento de Ciências Veterinárias, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro - UTAD, Vila Real, Portugal

⁴Grupo de Oncologia Molecular e Patologia Viral, CI-IPOP, Porto, Portugal

⁵Faculdade de Medicina, Universidade do Porto, Porto, Portugal

⁶LEPABE, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto, Portugal

Desde 2007 a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) reconhece o HPV como agente carcinógeno para neoplasia orofaríngea (9). Devido às grandes diferenças clínicas e prognósticas, a última classificação de CCP da Organização Mundial da Saúde (OMS), publicada em 2017, classifica os cânceres HPV positivo e HPV negativo como entidades diferentes (10).

Pacientes com CCP relacionados ao HPV costumam ser homens jovens, em uma proporção de sexo de 4:1, não fumantes, com tumores pequenos e metástase linfonodal no diagnóstico, porém geralmente com bom prognóstico, necessitando de terapias menos agressivas (11). No entanto, variações individuais existem e conhecer fatores associados ao comportamento tumoral pode ser útil para determinação de terapêuticas direcionadas.

As razões para maior incidência de CCP em homens que em mulheres permanecem desconhecidas. O meio hormonal é um importante fator de progressão tumoral, classicamente em se tratando de receptores de hormônios sexuais, com implicações diagnósticas e terapêuticas nos cânceres de mama (12) e próstata (13), contudo esses receptores também são expressos em diversos outros tecidos como o endotélio vascular (14), laringe (15) e epitélio pulmonar (16).

O papel dos receptores de hormônios sexuais no CCP ainda não está bem definido, com muita divergência na literatura. O receptor de estrogênio alfa (RE α) tem sido o principal receptor hormonal associado ao CCP, considerado um biomarcador de melhor prognóstico (17, 18). O receptor de estrogênio beta (RE β) é uma isoforma da variante α , também associada a bom prognóstico (19). O receptor de progesterona (RP) está presente na mucosa oral normal e nos carcinomas laríngeo e oral, geralmente com

bom prognóstico (20). Já o receptor de androgênio (RA) parece estar associado a um pior prognóstico, relacionado a uma maior chance de metástases (21).

Recentemente o nosso grupo descreveu que camundongos fêmeas transgênicos para HPV16 desenvolvem CCP especificamente na base da língua, uma região tipicamente afetada em pacientes com esse tipo de câncer (22). O objetivo do presente estudo foi comparar a incidência de CCP em camundongos machos e fêmeas transgênicos para HPV 16 e analisar a expressão dos receptores de estrogênio alfa e beta no CCP usando o modelo animal de animais transgênicos para HPV 16.

Metodologia

Animais e Amostras

Foram estudadas 289 amostras de cabeça e pescoço provenientes de 149 animais do modelo de animal transgênico K14-HPV16, escolhido por reproduzir o processo carcinogênico de múltiplos estágios que em doenças humanas (23). Destes 67 eram machos e 82 eram fêmeas. Foram utilizados 20 camundongos selvagens para grupo controle (10 machos e 10 fêmeas). Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (aprovação n.º 10/2013) de acordo com a Legislação Portuguesa (Portaria 1005/1992) e pela Legislação Europeia (EU Directive 2010/63/EU). Os animais foram acondicionados com temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo claro/escuro (12/12hs) e umidade relativa ($50 \pm 10\%$). Comida e água foram disponibilizadas à vontade (*ad libitum*). Os animais foram mantidos no Biotério da Universidade De Trás-os-Montes e Alto Douro, em Vila Real, Portugal. Ao término da 30ª semana de vida os animais foram sacrificados usando overdose de xilazina e cetamina seguida de exsanguinação por punção cardíaca. As amostras de cabeça e pescoço foram retiradas e parafinadas para estudo. A pesquisa foi realizada através da parceria entre a Universidade De Trás-os-Montes e Alto Douro, em Vila Real, Portugal e o Biobanco de Tumores e DNA do Maranhão (BTMA). A Universidade coletou as amostras de tecido e o Biobanco realizou o armazenamento e as colorações de histologia e imunohistoquímica dessas amostras.

Análise histológica para coloração de Hematoxilina e Eosina (H&E) e Picrosirius

As amostras foram coletadas para análise histológica e fixadas em formalina a 10% durante 48hs. Logo em seguida, os tecidos foram fixados e desidratados através de graduações de álcool e xileno e incorporados em parafina utilizando um processador

automático STP 120 (Micro, Boise, ID). Os blocos de parafina foram cortados em secções de 2 µm de espessura e corados com Hematoxilina e Eosina (H&E) e Picrosirius para avaliação sob um microscópio óptico. Os resultados foram expressos como a percentagem de animais mostrando um tipo histológico específico dentro do número total de animais em cada grupo. Para a coloração com H&E, os tipos histológicos estudados foram o normal, constituído de epitélio pavimentoso estratificado queratinizado apoiado sobre uma camada basal constituída de tecido conjuntivo; lesão intra-epitelial (LIE) com preservação da estrutura do epitélio, porém com a presença de atipias celulares, hiperplasia da camada basal e a presença de coilocitos; e carcinoma escamoso com verificação de desarranjo arquitetural do tecido, invasão de vasos e tecidos celulares adjacentes, aumento da relação núcleo/citoplasma das células e pleiomorfismo celular (24). Para coloração com Picrosirius, a rede de colágeno foi caracterizada com normal, aumentada ou muito aumentada segundo a avaliação de um patologista experiente.

Reações de Imunohistoquímica

Foram realizadas as reações de imunohistoquímica (IHQ) para receptores de estrogênio alfa e beta e para metaloproteinase - 2 (MMP-2). Para confecção das lâminas, as amostras de camundongos foram cortadas com 5 µm de espessura. Em seguida foi realizada a desparafinização das lâminas, com 02 banhos em xilol de 10 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram hidratadas em 02 banhos de álcool 99%, seguidos de 02 banhos de álcool 96% e 01 banho de álcool 70%. Após, foram lavadas em água corrente e água destilada e tratadas com peróxido de hidrogênio a 10% (H₂O₂) para inativar a atividade da peroxidase endógena. A recuperação antigênica ocorreu em panela de pressão elétrica em solução Trilogy (Cell Marque) por 15 minutos. Secções foram realizadas com um bloqueador proteico por 20 minutos e, em seguida, foram

incubados em câmara úmida durante a noite com os seguintes anticorpos primários na diluição 1:50: anti RE α (sc542 – Santa Cruz), anti RE β (orb100531 – Biorbyt), anti-RP (1E2 – Roche) e anti MMP-2 (sc1076 – Santa Cruz). As secções foram lavadas três vezes com TBS (pH 7,2). Após, as secções foram expostas ao anticorpo secundário por 30 minutos. O produto da reação foi obtido após secções de imersão em DAB líquido por 5 minutos. Na sequência foi feita coloração com hematoxilina e montagem das lâminas para análise. Os resultados foram analisados por um patologista experiente que quantificou as amostras quanto à porcentagem de células marcadas para os receptores (0 a 100%) e a intensidade das marcações (1 a 3). Com esses dados, foi calculado o escore H, resultante do produto entre a porcentagem de células marcadas e a intensidade da marcação, com variação entre 0 e 300 (25). Lâminas com no mínimo 1% de positividade foram consideradas positivas.

Análise, processamento de dados e testes estatísticos

Os dados coletados foram armazenados num banco de dados no programa Excel versão 2013 (Microsoft®) para a realização da análise descritiva das variáveis em estudo. A normalidade das variáveis contínuas foi verificada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Foi utilizado o teste do Qui-quadrado para avaliar as variáveis categóricas e o teste de Mann Whitney para avaliar as variáveis contínuas. Para a análise dos dados foi utilizado o *software* GraphPad Prism versão 8.4.3. Os dados categóricos foram apresentados em frequências absoluta e relativa e os dados contínuos foram apresentados em média $\pm$ desvio padrão. Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças com $p < 0.05$.

Resultados

Características das amostras

As fêmeas apresentaram um maior número de lesões malignas (23,2% *versus* 4,5% nas fêmeas) enquanto os machos apresentaram um maior número de lesões pré-malignas (73,1% *versus* 64,6%). As fêmeas apresentaram 12,2% de lesões benignas, os machos, 17,9%. Houve relevância significativa quanto ao tipo de lesão em comparação com o sexo, com $p = 0,0071$ (Figura 6) (Tabela 1).

Nenhum dos animais dos grupos controle apresentou lesões benignas, pré-malignas ou malignas.

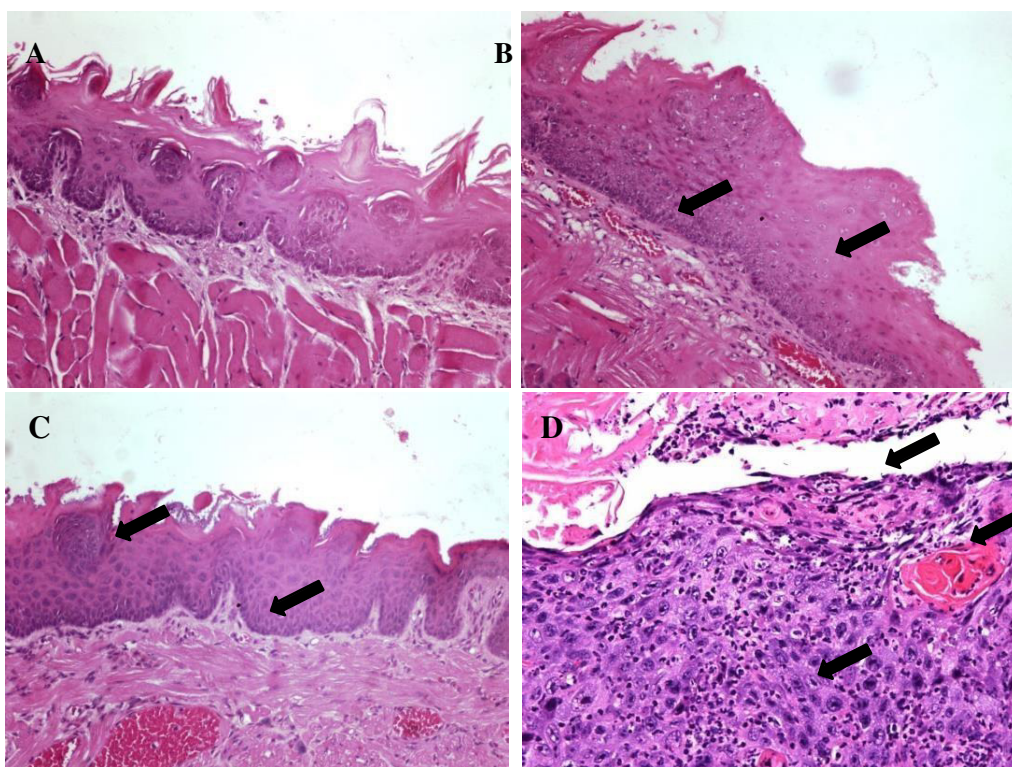


Figura 6: Padrão de coloração com Hematoxilina/Eosina de tecidos de cabeça e pescoço em diferentes estágios da carcinogênese. **A:** tecido da língua normal (amplificação 100x); **B:** papiloma com presença de coilócitos, sem alteração da camada basal (amplificação 100x). **C:** displasia com alargamento da camada basal, atipias celulares e menor número de coilócitos sem alteração arquitetural do epitélio (amplificação 100x). **D:** carcinoma de células escamosas com ilhas invasivas em tecido normal, distorção arquitetural, invasão vascular, aumento da relação núcleo/citoplasma celular e pleiomorfismo celular (amplificação 100x).

Tabela 1: Avaliação histológica quanto à natureza patológica das amostras de cabeça e pescoço de machos e fêmeas HPV positivo e HPV negativo

	Normal n (%)	LIBG n (%)	LIAG n (%)	Papiloma n (%)	Carcinoma n (%)	<i>p</i>
♀ HPV+	0	37 (45,1%)	16 (19,5%)	10 (12,2%)	19 (23,2%)	0,0071*
♀ HPV-	10 (100%)	0	0	0	0	
♂ HPV+	3 (4,5%)	30 (44,8%)	19 (28,3%)	12 (17,9%)	3 (4,5%)	
♂ HPV-	10 (100%)	0	0	0	0	

LIBG: lesão intraepitelial de baixo grau; LIAG: lesão intraepitelial de alto grau; ♀: fêmea; ♂: macho; * Diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

Com relação ao sítio de acometimento das lesões, a grande maioria, tanto em machos quanto em fêmeas, se localizava na língua, sobretudo na base da língua. As lesões malignas e benignas se localizaram quase que exclusivamente na base da língua, enquanto as lesões pré-malignas apresentaram distribuição principalmente em base da língua e língua dorsal. Houve diferença significativa na comparação entre o tipo de lesão e a localização em fêmeas ($p = 0,0003$), significância essa não verificada nos machos ($p = 0,5321$) (Tabela 2).

Tabela 2: Caracterização das lesões de cabeça e pescoço quanto ao sítio de localização em camundongos machos e fêmeas HPV positivo

	Base da língua n (%)	Língua dorsal n (%)	Língua ventral n (%)	Palato n (%)	Lábio n (%)	Outro n (%)	<i>p</i>
♀ HPV+							0,0003*
<i>LIE</i>	53 (40,7%)	61 (46,9%)	12 (9,3%)	0	4 (3,1%)	0	
<i>Papiloma</i>	10 (83,3%)	2 (16,7%)	0	0	0	0	
<i>Carcinoma</i>	19 (90,4%)	1 (4,8%)	1 (4,8%)	0	0	0	
♂ HPV+							0,5321
<i>LIE</i>	49 (44,5%)	43 (39,1%)	12 (10,1%)	2 (1,8%)	3 (2,7%)	1 (0,9%)	
<i>Papiloma</i>	12 (92,3%)	1 (7,7%)	0	0	0	0	
<i>Carcinoma</i>	3 (100%)	0	0	0	0	0	

LIE: lesão intraepitelial; * Diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

A rede de colágeno foi avaliada nas amostras tumorais de machos e fêmeas por meio da coloração com Picrosirius (Figura 7). Foi considerada normal em todas as amostras de machos e aumentada em 77,8% das amostras de fêmea, com aumento muito expressivo em 38,9% das amostras. Em comparação com os resultados dos machos, houve diferença estatisticamente significativa com $p = 0,0307$. (Tabela 3)

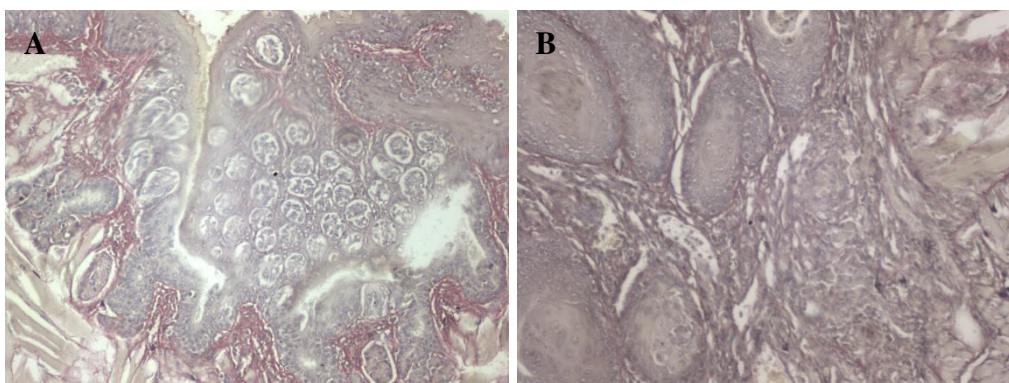


Figura 7: Coloração histoquímica pelo picrosírius em tecidos de camundongos, 100x. **A:** Fêmea HPV⁻, mucosa oral normal. Papila circunvalada. Notar rede de colágeno na lâmina própria com coloração vermelha. **B:** Fêmea HPV⁺, carcinoma escamoso da base da língua. Notar desorganização do colágeno no estroma tumoral.

Tabela 3: Caracterização da rede de colágeno segundo a coloração por Picrosirius em lesões de cabeça e pescoço camundongos machos e fêmeas HPV positivo

	Fêmea n (%)	Macho n (%)	P
Normal	2 (22,2%)	5 (100%)	0,0307*
Aumentado	3 (38,9%)	0	
Muito aumentado	3 (38,9%)	0	

* Diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

Avaliação Imunohistoquímica

Nas fêmeas, o RE α esteve presente em 71% e o RE β em 43% das amostras tumorais avaliadas. Nos tumores de machos não houve expressão de RE α ou RE β (Figuras 8, 9, 10 e 11). Não houve coloração para RP nas amostras estudadas (Figura 12).

Foram avaliadas células tumorais, células de lesões intraepiteliais (LIE) e células do estroma tumoral e do estroma das LIE. Houve uma maior expressão tanto de RE α quanto de RE β nas células de fêmeas, com diferença considerada estatisticamente significativa para RE α no estroma de lesões pré-malignas e estroma tumoral (p igual a 0,0005 e 0,0278 respectivamente) e para RE β no estroma de lesões pré-malignas (p igual a 0,0005) (Figuras 13 e 14).

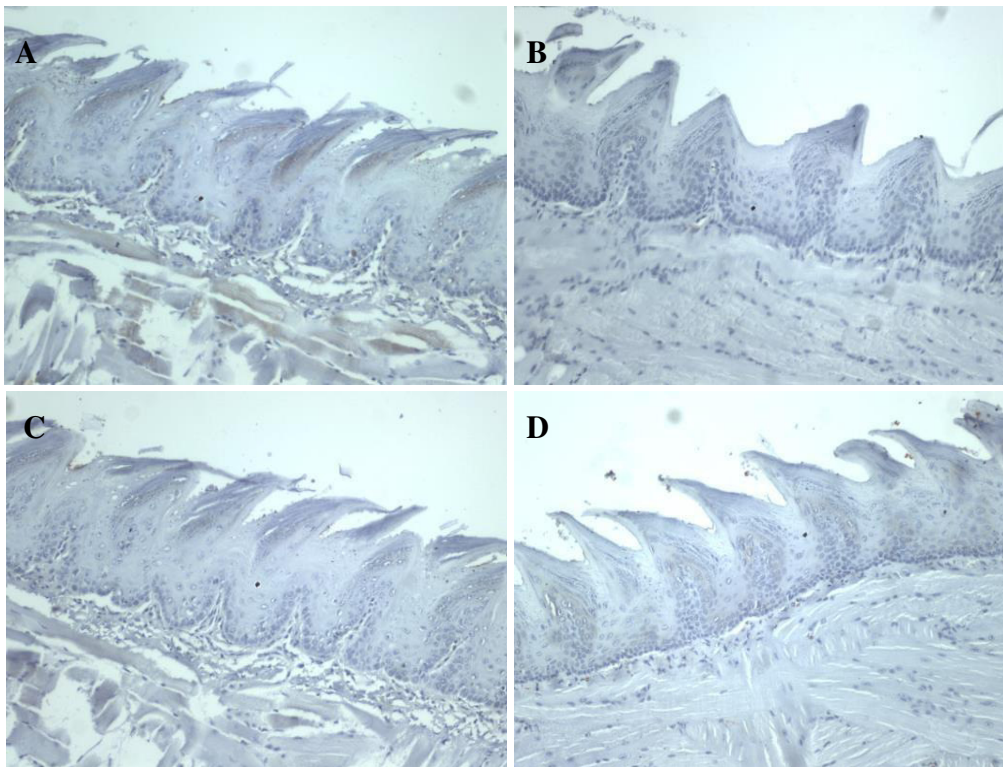


Figura 8: Imunohistoquímica para detecção dos receptores de estrogênio alfa (RE α) e beta (RE β) em mucosa oral normal de camundongos, DAB-hematoxilina de Harris, 400x. **A:** Fêmea HPV-, imunohistoquímica para RE α . **B:** Macho HPV-, imunohistoquímica para RE α . **C:** Fêmea HPV-, imunohistoquímica para RE β . **D:** Macho HPV-, imunohistoquímica para RE β .

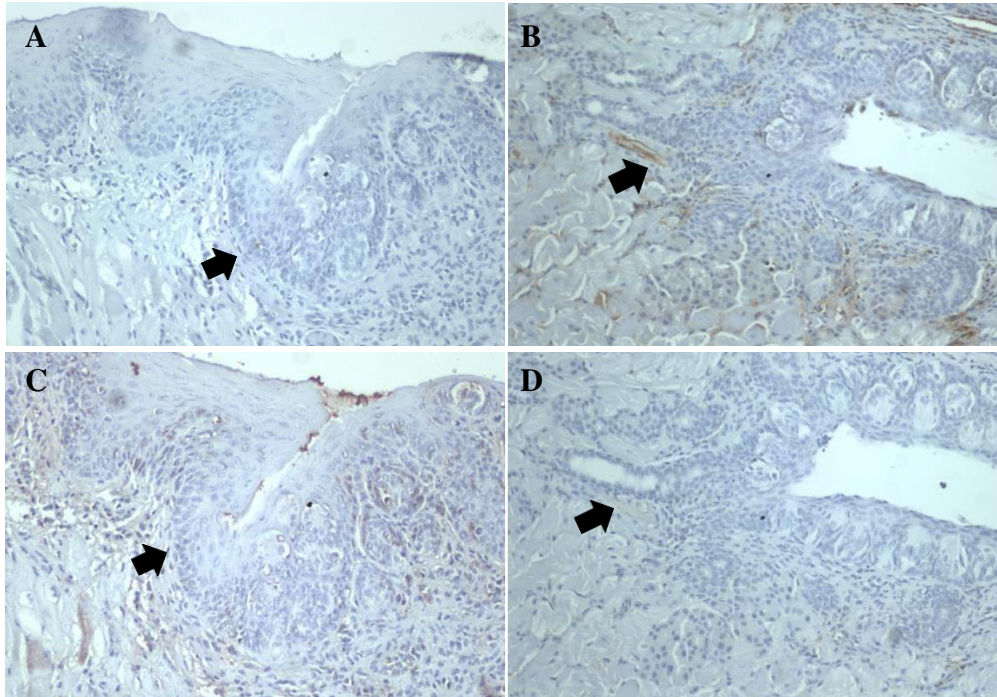


Figura 9: Imunohistoquímica para detecção dos receptores de estrogênio alfa ($RE\alpha$) e beta ($RE\beta$) na papila circunvalada lingual de camundongos, DAB-hematoxilina de Harris, 100x. **A:** Fêmea HPV-, imunohistoquímica para $RE\alpha$. **B:** Macho HPV-, imunohistoquímica para $RE\alpha$. **C:** Fêmea HPV-, imunohistoquímica para $RE\beta$. **D:** Macho HPV-, imunohistoquímica para $RE\beta$. Notar ausência de expressão na junção escamosa-colunar com os ductos da glândula de von Ebner (setas).

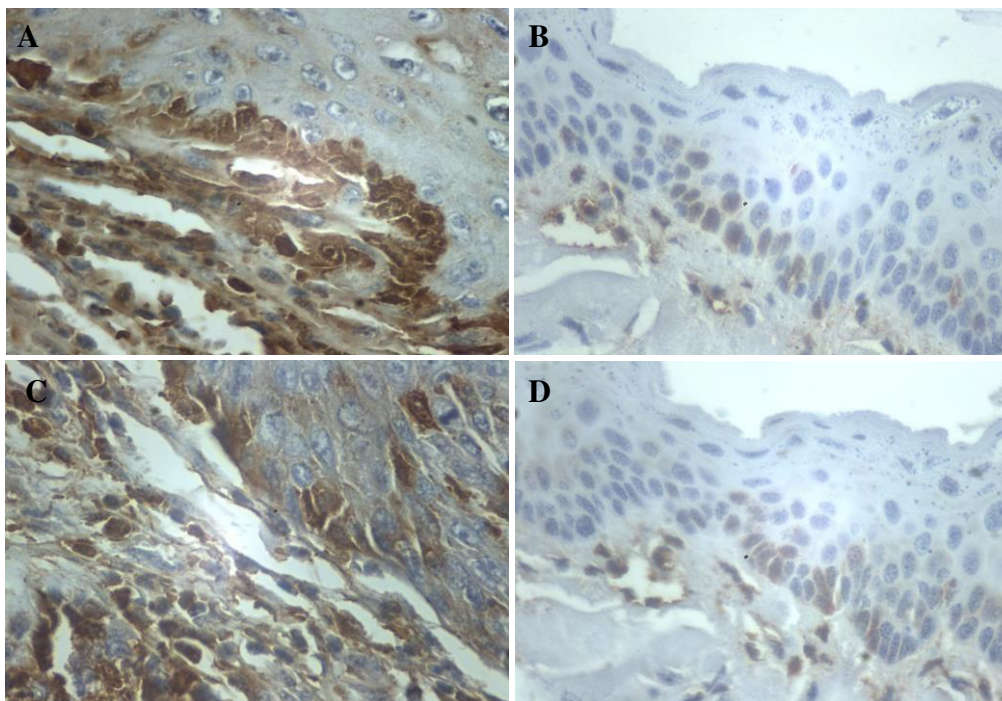


Figura 10: Imunohistoquímica para detecção dos receptores de estrogênio alfa ($RE\alpha$) e beta ($RE\beta$) em lesões intraepiteliais orais de camundongos transgênicos para o HPV16, DAB-hematoxilina de Harris, 400x. **A:** Fêmea HPV+, imunohistoquímica para $RE\alpha$. **B:** Macho HPV+, imunohistoquímica para $RE\alpha$. **C:** Fêmea HPV+, imunohistoquímica para $RE\beta$. **D:** Macho HPV+, imunohistoquímica para $RE\beta$.

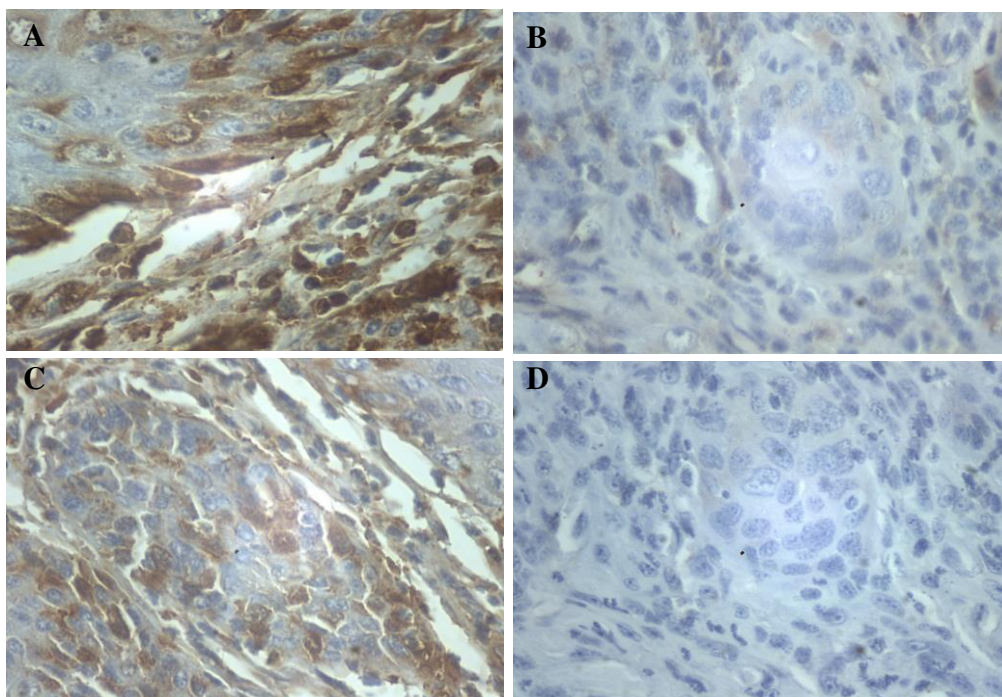


Figura 11: Imunohistoquímica para detecção dos receptores de estrogênio alfa ($RE\alpha$) e beta ($RE\beta$) em carcinomas escamosos orais de camundongos transgênicos para o HPV16, DAB-hematoxilina de Harris, 400x. **A:** Fêmea HPV⁺, imunohistoquímica para $RE\alpha$. **B:** Macho HPV⁺, imunohistoquímica para $RE\alpha$. **C:** Fêmea HPV⁺, imunohistoquímica para $RE\beta$. **D:** Macho HPV⁺, imunohistoquímica para $RE\beta$.

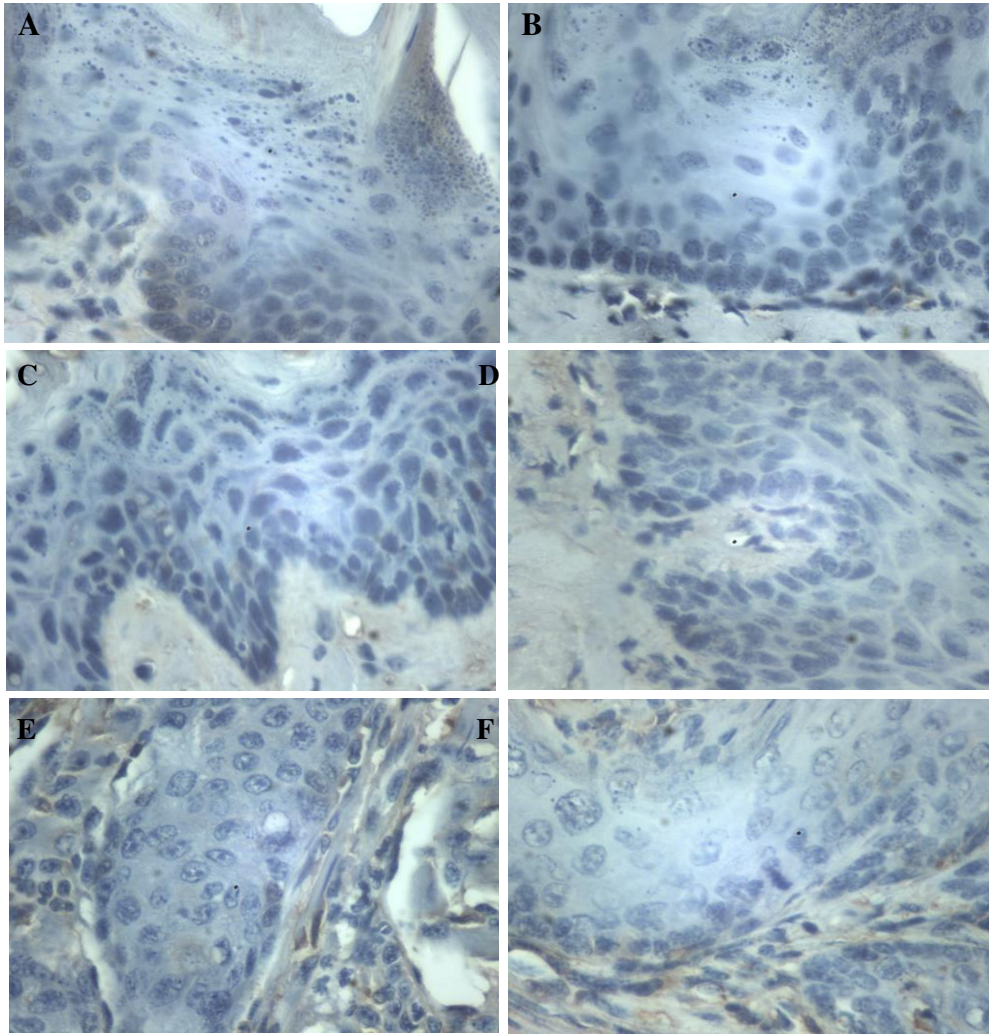


Figura 12: Imunohistoquímica para detecção do receptor de progesterona em tecidos de camundongos, DAB-hematoxilina de Harris, 400x. **A:** Fêmea HPV⁻, mucosa oral normal. **B:** Macho HPV⁻, mucosa oral normal. **C:** Fêmea HPV⁺, lesão intraepitelial. **D:** Macho HPV⁺, lesão intraepitelial. **E:** Fêmea HPV⁺, carcinoma escamoso da base da língua. **F:** Macho HPV⁺, carcinoma escamoso da base da língua.

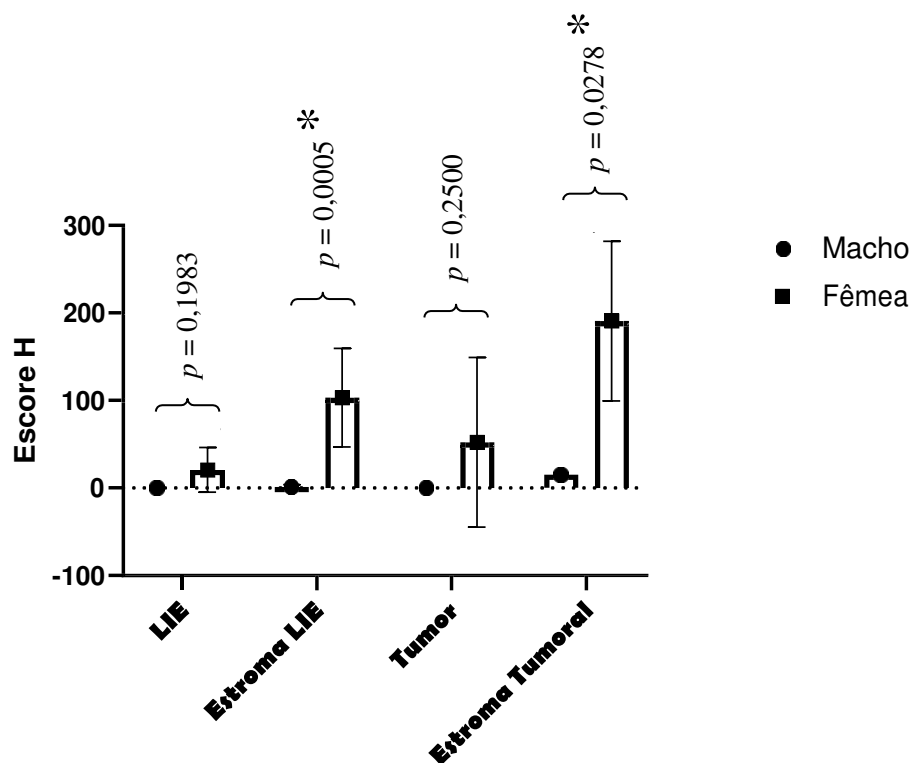


Figura 13: Escore H da expressão de RE α de lesões malignas e pré-malignas e seus respectivos estromas em amostras de cabeça e pescoço de animais transgênicos para HPV16. LIE: lesão intraepitelial; * Diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$

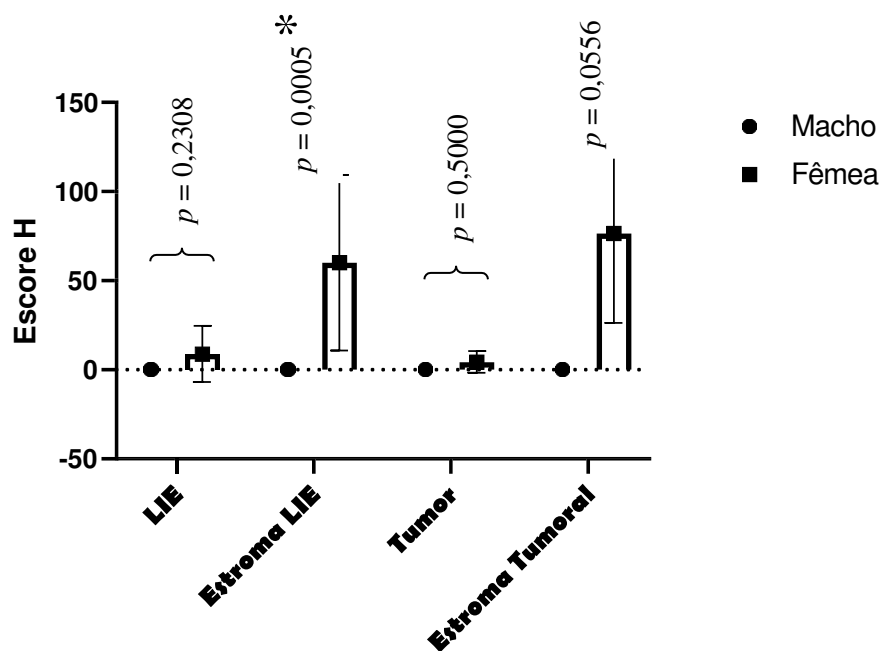


Figura 14: Escore H da expressão de RE β de lesões malignas e pré-malignas e seus respectivos estromas em amostras de cabeça e pescoço de animais transgênicos para HPV16. LIE: lesão intraepitelial; * Diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

A expressão de metaloproteinase-2 (MMP-2) esteve presente em 67% das amostras tumorais de fêmeas e 20% das amostras tumorais de machos.

Nas fêmeas, o RE α esteve presente em 71% e o RE β em 43% das amostras tumorais avaliadas. Foram avaliadas células tumorais, células de LIE e células do estroma tumoral e do estroma das LIE. Houve uma maior expressão de MMP-2 nas células de fêmeas, com diferença considerada estatisticamente significativa verificada nas células de LIE das fêmeas ($p = 0,0151$). (Tabela 4) (Figura 15)

Tabela 4: Escore H da expressão de MMP-2 de lesões malignas e pré-malignas e seus respectivos estromas em amostras de cabeça e pescoço de animais transgênicos para HPV16.

	Macho	Fêmea	<i>P</i>
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	
Tumor	12 $\pm$ 26,83	28,89 $\pm$ 28,04	0,2948
Estroma tumoral	4 $\pm$ 8,94	57,78 $\pm$ 59,32	0,0712
LIE	16 $\pm$ 21,91	107,78 $\pm$ 69,42	0,0151*
Estroma LIE	32 $\pm$ 16,43	113,33 $\pm$ 107,24	0,1237

LIE: lesão intraepitelial; * Diferença estatisticamente significativa, com $p < 0,05$.

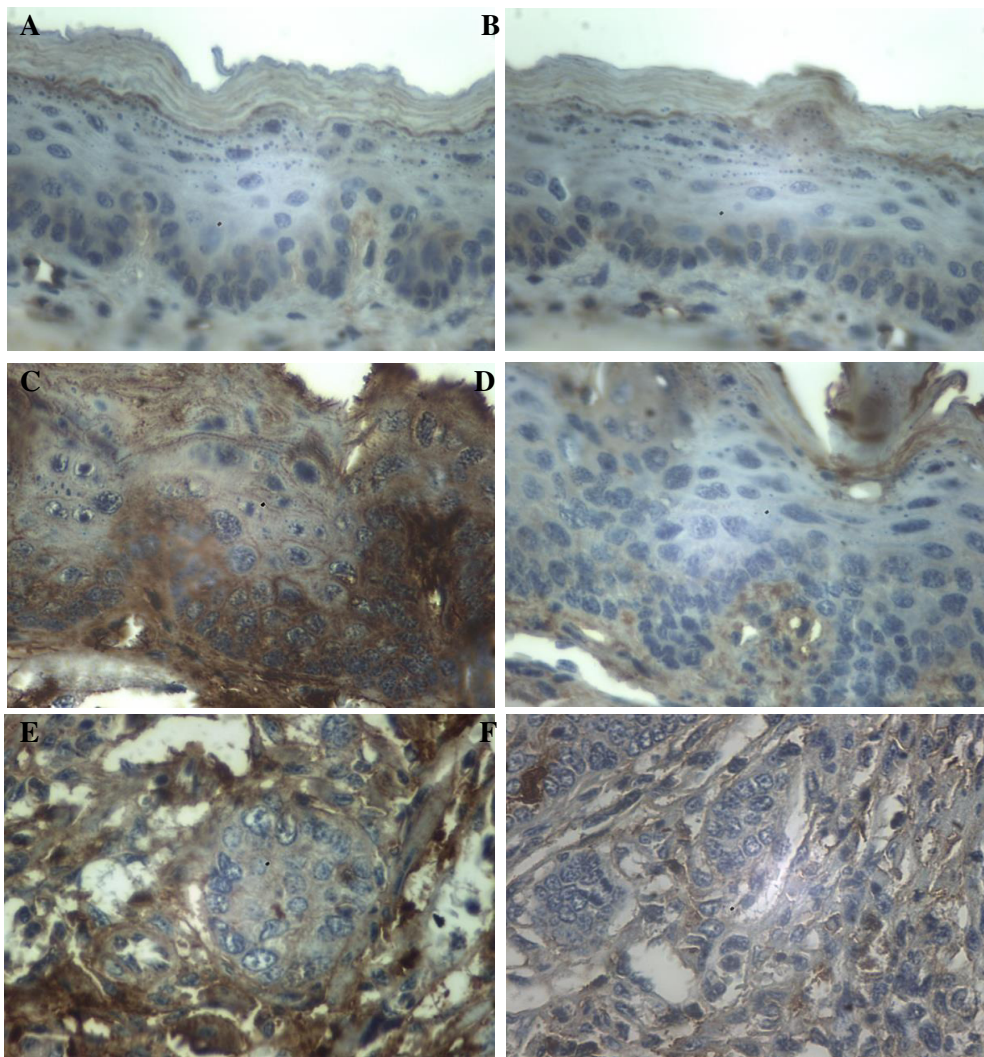


Figura 15: Imunohistoquímica para detecção de metaloproteinase-2 em tecidos de camundogos, DAB-hematoxilina de Harris, 400x. **A:** Fêmea HPV⁻, mucosa oral normal. **B:** Macho HPV⁻, mucosa oral normal. **C:** Fêmea HPV⁺, lesão intraepitelial. Notar intensa imunomarcagem no epitélio e tecido conjuntivo subjacente. **D:** Macho HPV⁺, lesão intraepitelial. Notar imunomarcagem mínima no epitélio e tecido conjuntivo subjacente. **E:** Fêmea HPV⁺, carcinoma escamoso da base da língua. Notar imunomarcagem leve nas células tumorais e intensa no estroma. **F:** Macho HPV⁺, carcinoma escamoso da base da língua. Notar imunomarcagem leve e restrita ao estroma tumoral.

Discussão

Nesse estudo, analisamos a expressão de receptores de estrogênio em tecidos normais e patológicos de cabeça e pescoço. Encontramos expressão positiva para RE α e RE β em lesões pré-malignas e malignas de fêmeas transgênicas para HPV16, o que não foi verificado nos machos. Porém não foi encontrada diferença estatisticamente significativa para expressão de RE α e RE β em lesões pré-malignas ($p = 0,1983$ e $p = 0,2308$, respectivamente) nem em lesões malignas ($p = 0,2500$ e $p = 0,5000$, respectivamente). Um dado que chama atenção é a maior prevalência de lesões tumorais (carcinomas) em fêmeas (23,2%) que em machos (4,5%) ($p = 0,0071$), resultado que confronta a literatura vigente, pois epidemiologicamente o CCP acomete mais homens que mulheres (11).

O RE α foi expresso em 71% das lesões tumorais das fêmeas, dados semelhantes aos encontrados por Kwon et al. (17) que encontrou positividade na metade das amostras estudadas. O RE β foi verificado em 43% das lesões tumorais das fêmeas, confirmando os achados de Grsic et al. que verificaram positividade em 42% dos cânceres estudados (19). Apesar desses achados, a frequência da expressão de receptores de estrogênio é variável, provavelmente devido à positividade para HPV (18).

Embora o papel do RE α no CCP ainda não seja bem determinado, já existe evidência suficiente de que o RE α desempenha função na carcinogênese do câncer do colo do útero, além de ação no estabelecimento e progressão tumoral, observados em estudos com modelos de camundongos transgênicos. A exposição dos animais ao estrogênio teve relação com o tamanho e com a agressividade tumoral em uma relação dose e tempo dependentes (26-29). Um estudo realizado por Roura et al. em 2016

encontrou que situações relacionadas ao hiperestrogenismo, como a gravidez e o uso de contraceptivos hormonais orais, estiveram relacionados a um maior risco de desenvolver câncer cervical, enquanto que mulheres em menopausa e mesmo aquelas que faziam uso de terapia hormonal tiveram um menor risco (30).

Além disso, a aromatase expressa por células tumorais tem sido relacionada à conversão de androgênio em estrogênio, induzindo a expressão cervical de RE α (31). Esses achados podem indicar um mecanismo semelhante envolvendo o RE α na patogênese do CCP HPV positivo, embora esses tecidos apresentem perfis diferentes de expressão de RE α , com positividade em 93% de tecido cervical normal e 18,7% de tecido de cabeça e pescoço normal (17). Com relação à expressão de RE α em tecidos de cabeça e pescoço, há uma distribuição não uniforme, em que o RE α é verificado principalmente nas tonsilas e nas criptas epiteliais, o que poderiam ser sítios favoráveis à infecção viral pelo HPV, integração genômica e culminar com o desenvolvimento neoplásico (32). No que diz respeito às lesões tumorais, o RE α parece ser expresso apenas no CCP HPV positivo, sugerindo que o RE α possua influência no desenvolvimento do câncer por meio da interação com o HPV. Kano et al. encontraram uma correlação positiva entre RE α e a APOBECA3, uma apolipoproteína que facilita a integração do genoma do HPV ao genoma celular, favorecendo o processo de transcrição e carcinogênese (18).

Apesar de esclarecedores, esses resultados não são unânimes. Bekkers et al sugeriram o contrário, que a baixa expressão de RE α seria o a alteração inicial a ocorrer no epitélio normal na carcinogênese cervical relacionada ao HPV (33). Essa informação é reforçada pelos achados de Nonogaki et al. que nos anos 90 também correlacionaram a perda da expressão cervical de RE α com a presença de tumores e com a agressividade dos mesmos, sobretudo quando relacionados aos HPVs de alto risco (34). Outro estudo

em tumores do colo uterino também mostrou que as células malignas perderam sua expressão para RE α , mas mantêm a expressão de RE β (35). Não existe evidência suficiente para extrapolar esses resultados para o CCP, no entanto, as divergências na literatura podem ser justificadas com base nessas diferenças, em que a positividade para RE α se correlaciona a um melhor prognóstico (17, 18).

Ainda no câncer cervical há grande importância do microambiente do estroma tumoral no processo de carcinogênese. Ao que parece, a sinalização estromal de estrogênio apresenta sinergismo com a expressão dos oncogenes do HPV, promovendo a carcinogênese cervical (36, 37). Estudo conduzido por Spurgeon et al. em 2017 com camundongos transgênicos para HPV16 verificou que a expressão dos oncogenes do HPV induziram mudanças significativas na expressão gênica no compartimento estromal e o tratamento estrogênico afetou exclusivamente o microambiente cervical dos camundongos transgênicos (37). Em 2013, Chung et al já haviam demonstrado que a deleção do RE α estromal induziu a regressão completa de displasia cervical em camundongos transgênicos (38). Em nossos resultados, encontramos uma expressão significativa de RE α no estroma de lesões intraepiteliais ($p = 0,0005$) e tumorais ($p = 0,0278$) de CCP, o que corrobora a hipótese proposta no câncer cervical a cerca da carcinogênese do HPV relacionada ao receptor de estrogênio.

Apesar de estudos identificarem a presença de ambos REs nos CCPs, poucos estudos investigaram a relação entre a expressão de RE β e a infecção pelo HPV nesses tumores, e isso tem sido atribuído ao conhecimento limitado acerca de sua função e significado clinicopatológico, tendo em vista a sua descoberta recente (39, 40). Em nosso estudo, encontramos expressão de RE β tanto em lesões pré-malignas quanto em lesões malignas de fêmeas, porém sem diferença estatisticamente significativa quando comparada às lesões dos machos. A primeira correlação entre RE β e CCP foi

estabelecida em 2016 por Grsic et al. que encontraram positividade para RE β em 42% dos pacientes estudados e esse resultado esteve associado a uma melhor sobrevida. No entanto, esse estudo não definiu o *status* de HPV das amostras (19). Outro estudo avaliou a expressão de RE β no câncer de laringe e demonstrou que esta apresentou correlação positiva com a manutenção de E-caderina e β -catenina nas junções celulares e negativa com estágios avançados na classificação TNM, o que sugere um papel protetivo do RE β nessa neoplasia (41).

Lukits et al. estudaram a expressão de REs nos CCPs e encontraram positividade para RE α e RE β em 50% dos pacientes estudados, contudo a positividade para esses receptores não demonstrou influência no prognóstico (42). Mohamed et al. verificaram presença de RE β em 63% dos tumores avaliados, no entanto não foi verificada associação estatística com a positividade para HPV ou com a sobrevida dos pacientes (43). Ishida et al. encontraram a expressão apenas de RE β em CCP e demonstraram, em estudo com cultura de células, que o tratamento com antagonistas do RE resultou em apoptose de células tumorais (44).

Um achado adicional que encontramos foi a positividade para RE β no estroma de lesões pré-malignas nas fêmeas, com significância estatística quando comparado às lesões nos machos ($p = 0,0005$). Não encontramos na literatura dados referentes à expressão de RE β no estroma de lesões malignas ou pré-malignas, sendo este, para o nosso conhecimento, o primeiro estudo a encontrar esse resultado.

Chama atenção em todo esse contexto a associação entre o estrogênio, um hormônio sexual feminino, com o CCP, um câncer mais comum no sexo masculino. Estudos não encontraram associação entre sexo e a expressão de RE no CCP (18, 19). A hipótese que hoje mais justifica esse achado se baseia no fato de que no sexo feminino

os níveis de estrogênio variam ao longo da vida, com drástica diminuição após a menopausa. Já no sexo masculino os níveis permanecem praticamente estáveis durante toda a vida, inclusive em valores maiores que em mulheres na pós-menopausa. Assim, a combinação entre idade avançada e níveis elevados de estrogênio poderiam, quando associados, ser o motivo do maior acometimento de CCP em homens que em mulheres (45).

Alguns estudos reportaram que pacientes com CCP associado ao HPV possuem melhor prognóstico e melhor resposta terapêutica que aquele associado ao tabagismo (46-48). Esse achado tem sido atribuído à condição da p53, que na neoplasia associada ao HPV apresenta-se supressa pelos oncogenes virais, enquanto naquele associado ao tabagismo há uma mutação desse supressor tumoral e isso se associa a pior sobrevida (49, 50). Assim como a presença de HPV e a mutação da p53, a identificação de outros biomarcadores para melhor e pior prognóstico é importante para a melhor tomada de decisões, e o RE α tem sido um biomarcador promissor nesse sentido (17, 18).

As metaloproteinases de matriz (MMP) são endopeptidases dependentes de zinco com funções implicadas em vários processos normais e patológicos (51). Seu papel no câncer tem sido bastante estudado nos últimos anos e, em relação ao CCP, é associada à proliferação celular, angiogênese, invasão e metástase, sugerindo sua utilização como fator prognóstico em lesões malignas e pré-malignas (52,53). Sua correlação com tumores hormônio dependentes é estudada mais extensamente no câncer de mama, principalmente em relação ao papel de MMP-2 e MMP-9, às quais são implicadas na degradação do colágeno tipo IV da membrana basal e associadas a pior prognóstico, com aumento do número de metástases e menor sobrevida (54). Nesses cânceres o estrogênio desempenha um papel fundamental de ativação das MMPs e o

tamoxifeno, um antagonista seletivo do receptor de estrogênio, demonstrou um potencial de inativação dessa via de propagação tumoral (55).

Em nosso estudo, encontramos expressão de MMP-2 em tecidos de lesões malignas e pré-malignas de machos e fêmeas transgênicos, no entanto diferença estatística só foi verificada nas amostras de LIE ($p = 0,0151$). Verificamos uma correlação de força moderada ($r = - 0,64$) entre a expressão de MMP-2 e RE α , o que sugere que a mesma de ativação de MMP-2 observada no câncer de mama possa ocorrer no CCP. Outros estudos já relacionaram MMP-2 ao aparecimento de lesões pré-malignas de cabeça e pescoço como demonstrado em nossos resultados (56).

No geral, é possível que a sinalização de estrogênio via RE α e/ou RE β desempenhe um papel significativo no CCP positivo para HPV, nomeadamente promovendo a integração viral no genoma da célula hospedeira, conforme observado no câncer cervical. Evidências adicionais são necessárias para definir o possível papel de outros receptores hormonais.

Em conclusão, nosso estudo verificou a presença de RE α no estroma de lesões pré-malignas e malignas de cabeça e pescoço em animais fêmeas transgênicas para HPV16. Esse achado corrobora com a literatura vigente sobre o papel dos receptores de estrogênio na fisiopatologia do CCP relacionado ao HPV. Encontramos ainda uma correlação moderada entre a expressão de RE α e MMP-2 em lesões intraepiteliais e tumores de cabeça e pescoço. A expressão de receptores hormonais pode ter valor prognóstico, se estudada nos subgrupos de tumores específicos. O uso desses receptores como alvos terapêuticos ainda não é uma realidade. No entanto, é tentador especular que os subgrupos ou até mesmo estágios de CCP podem se beneficiar de terapias

combinadas de moduladores de receptores hormonais com medicamentos anti-RE (por exemplo, tamoxifeno).

Referências

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2020 Jan;70(1):7-30. PubMed PMID: 31912902. Epub 2020/01/09. eng.
2. Takenaka Y, Yasui T, Enomoto K, Miyabe H, Morizane N, Ashida N, et al. Health insurance status and survival among patients with head and neck cancer in Japan. *International journal of clinical oncology*. 2016 Jun;21(3):517-22. PubMed PMID: 26547423. Epub 2015/11/09. eng.
3. Jethwa AR, Khariwala SS. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2017 Sep;36(3):411-23. PubMed PMID: 28801840. Pubmed Central PMCID: PMC5709040. Epub 2017/08/13. eng.
4. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine*. 2001 Apr 12;344(15):1125-31. PubMed PMID: 11297703. Epub 2001/04/12. eng.
5. Berman TA, Schiller JT. Human papillomavirus in cervical cancer and oropharyngeal cancer: One cause, two diseases. *Cancer*. 2017 Jun 15;123(12):2219-29. PubMed PMID: 28346680. Epub 2017/03/28. eng.
6. Maxwell JH, Grandis JR, Ferris RL. HPV-Associated Head and Neck Cancer: Unique Features of Epidemiology and Clinical Management. *Annu Rev Med*. 2016;67:91-101. PubMed PMID: 26332002. Pubmed Central PMCID: PMC5242186. Epub 2015/09/04. eng.
7. 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. *The Lancet Oncology*. 2016 2016/04/01;17(4):440-51.
8. Götz C, Bischof C, Wolff KD, Kolk A. Detection of HPV infection in head and neck cancers: Promise and pitfalls in the last ten years: A meta-analysis. *Mol Clin Oncol*. 2019 Jan;10(1):17-28. PubMed PMID: 30655973. Pubmed Central PMCID: PMC6313947. Epub 2019/01/19. eng.
9. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, et al. *Human papillomaviruses*. Vol. 90. World Health Organization, 2007.
10. El-Naggar AK, Chan JKC, Takata T, Grandis JR, Slootweg PJ. The fourth edition of the head and neck World Health Organization blue book: editors' perspectives. *Human pathology*. 2017 Aug;66:10-2. PubMed PMID: 28583885. Epub 2017/06/07. eng.
11. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(1):24-35. PubMed PMID: 20530316.
12. Sommer S, Fuqua SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Seminars in cancer biology*. 2001 Oct;11(5):339-52. PubMed PMID: 11562176. Epub 2001/09/20. eng.

13. Mohler JL, Gregory CW, Ford OH, 3rd, Kim D, Weaver CM, Petrusz P, et al. The androgen axis in recurrent prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004 Jan 15;10(2):440-8. PubMed PMID: 14760063. Epub 2004/02/05. eng.
14. Tolbert T, Thompson JA, Bouchard P, Oparil S. Estrogen-induced vasoprotection is independent of inducible nitric oxide synthase expression: evidence from the mouse carotid artery ligation model. *Circulation*. 2001 Nov 27;104(22):2740-5. PubMed PMID: 11723029. Epub 2001/11/28. eng.
15. Marsigliante S, Muscella A, Resta L, Storelli C. Human larynx expresses isoforms of the oestrogen receptor. *Cancer letters*. 1996 1996/02/06;99(2):191-6.
16. Stabile LP, Siegfried JM. Estrogen receptor pathways in lung cancer. *Current Oncology Reports*. 2004 2004/08/01;6(4):259-67.
17. Kwon S, Ahn S-H, Jeong W-J, Jung YH, Bae YJ, Paik JH, et al. Estrogen receptor α as a predictive biomarker for survival in human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Translational Medicine*. 2020 2020/06/16;18(1):240.
18. Kano M, Kondo S, Wakisaka N, Wakae K, Aga M, Moriyama-Kita M, et al. Expression of estrogen receptor alpha is associated with pathogenesis and prognosis of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer. *International Journal of Cancer*. 2019;145(6):1547-57.
19. Grsic K, Opacic IL, Sitic S, Milkovic Perisa M, Suton P, Sarcevic B. The prognostic significance of estrogen receptor β in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2016 Nov;12(5):3861-5. PubMed PMID: 27895741. Pubmed Central PMCID: PMC5104185. Epub 2016/11/30. eng.
20. Grimm M, Biegner T, Teriete P, Hoefert S, Krimmel M, Munz A, et al. Estrogen and Progesterone hormone receptor expression in oral cavity cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016 Sep 1;21(5):e554-8. PubMed PMID: 27475696. Pubmed Central PMCID: PMC5005091. Epub 2016/08/01. eng.
21. Liu X, Qing S, Che K, Li L, Liao X. Androgen receptor promotes oral squamous cell carcinoma cell migration by increasing EGFR phosphorylation. *Onco Targets Ther*. 2019;12:4245-52. PubMed PMID: 31239703. Pubmed Central PMCID: PMC6557262. Epub 2019/06/27. eng.
22. Mestre VF, Medeiros-Fonseca B, Estêvão D, Casaca F, Silva S, Félix A, et al. HPV16 is sufficient to induce squamous cell carcinoma specifically in the tongue base in transgenic mice. *The Journal of Pathology*. 2020;251(1):4-11.
23. Arbeit JM, Münger K, Howley PM, Hanahan D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Journal of virology*. 1994;68(7):4358.
24. Westra WH. The pathology of HPV-related head and neck cancer: implications for the diagnostic pathologist. *Seminars in diagnostic pathology*. 2015 Jan;32(1):42-53. PubMed PMID: 25804343. Epub 2015/03/26. eng.

25. Zhang X, Coleman IM, Brown LG, True LD, Kollath L, Lucas JM, et al. SRRM4 Expression and the Loss of REST Activity May Promote the Emergence of the Neuroendocrine Phenotype in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2015;21(20):4698.
26. Moreno V, Bosch FX, Muñoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, et al. Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet (London, England)*. 2002 Mar 30;359(9312):1085-92. PubMed PMID: 11943255. Epub 2002/04/12. eng.
27. Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *Journal of virology*. 2004 Nov;78(21):11451-60. PubMed PMID: 15479788. Pubmed Central PMCID: PMC523272. Epub 2004/10/14. eng.
28. Senapati R, Senapati NN, Dwivedi B. Molecular mechanisms of HPV mediated neoplastic progression. *Infect Agent Cancer*. 2016;11:59-. PubMed PMID: 27933097. eng.
29. Brake T, Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 Feb 15;102(7):2490-5. PubMed PMID: 15699322. Pubmed Central PMCID: PMC548999. Epub 2005/02/09. eng.
30. Roura E, Travier N, Waterboer T, de Sanjosé S, Bosch FX, Pawlita M, et al. The Influence of Hormonal Factors on the Risk of Developing Cervical Cancer and Pre-Cancer: Results from the EPIC Cohort. *PloS one*. 2016;11(1):e0147029. PubMed PMID: 26808155. Pubmed Central PMCID: PMC4726518. Epub 2016/01/26. eng.
31. Nair HB, Luthra R, Kirma N, Liu YG, Flowers L, Evans D, et al. Induction of aromatase expression in cervical carcinomas: effects of endogenous estrogen on cervical cancer cell proliferation. *Cancer research*. 2005 Dec 1;65(23):11164-73. PubMed PMID: 16322267. Epub 2005/12/03. eng.
32. Koenigs MB, Lefranc-Torres A, Bonilla-Velez J, Patel KB, Hayes DN, Glomski K, et al. Association of Estrogen Receptor Alpha Expression With Survival in Oropharyngeal Cancer Following Chemoradiation Therapy. *Journal of the National Cancer Institute*. 2019 Sep 1;111(9):933-42. PubMed PMID: 30715409. Pubmed Central PMCID: PMC6748818. Epub 2019/02/05. eng.
33. Bekkers R, van der Avoort I, Melchers W, Bulten J, Wilde P, Massuger L. Down regulation of estrogen receptor expression is an early event in human papillomavirus infected cervical dysplasia. *European journal of gynaecological oncology*. 2005 02/01;26:376-82.
34. Nonogaki H, Fujii S, Konishi I, Nanbu Y, Ozaki S, Ishikawa Y, et al. Estrogen receptor localization in normal and neoplastic epithelium of the uterine cervix. *Cancer*. 1990;66(12):2620-7.
35. López-Romero R, Garrido-Guerrero E, Rangel-López A, Manuel-Apolinar L, Piña-Sánchez P, Lazos-Ochoa M, et al. The cervical malignant cells display a down

regulation of ER- α but retain the ER- β expression. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(8):1594-602. PubMed PMID: 23923078. eng.

36. den Boon JA, Pyeon D, Wang SS, Horswill M, Schiffman M, Sherman M, et al. Molecular transitions from papillomavirus infection to cervical precancer and cancer: Role of stromal estrogen receptor signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015 Jun 23;112(25):E3255-64. PubMed PMID: 26056290. Pubmed Central PMCID: PMC4485108. Epub 2015/06/10. eng.

37. Spurgeon ME, den Boon JA, Horswill M, Barthakur S, Forouzan O, Rader JS, et al. Human papillomavirus oncogenes reprogram the cervical cancer microenvironment independently of and synergistically with estrogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2017 Oct 24;114(43):E9076-E85. PubMed PMID: 29073104. Pubmed Central PMCID: PMC5664542. Epub 2017/10/27. eng.

38. Chung SH, Shin MK, Korach KS, Lambert PF. Requirement for stromal estrogen receptor alpha in cervical neoplasia. *Hormones & cancer*. 2013 Feb;4(1):50-9. PubMed PMID: 23065599. Pubmed Central PMCID: PMC3541456. Epub 2012/10/16. eng.

39. Shim GJ, Gherman D, Kim HJ, Omoto Y, Iwase H, Bouton D, et al. Differential expression of oestrogen receptors in human secondary lymphoid tissues. *J Pathol*. 2006 Feb;208(3):408-14. PubMed PMID: 16294372. Epub 2005/11/19. eng.

40. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(12):5925-30. PubMed PMID: 8650195. eng.

41. Goulioumis AK, Fuxe J, Varakis J, Repanti M, Goumas P, Papadaki H. Estrogen receptor-beta expression in human laryngeal carcinoma: correlation with the expression of epithelial-mesenchymal transition specific biomarkers. *Oncol Rep*. 2009 Nov;22(5):1063-8. PubMed PMID: 19787222. Epub 2009/09/30. eng.

42. Lukits J, Remenár E, Rásó E, Ladányi A, Kásler M, Tímár J. Molecular identification, expression and prognostic role of estrogen- and progesterone receptors in head and neck cancer. *International journal of oncology*. 2007 Jan;30(1):155-60. PubMed PMID: 17143524. Epub 2006/12/05. eng.

43. Mohamed H, Aro K, Jouhi L, Mäkitie A, Remes S, Haglund C, et al. Expression of hormone receptors in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 2018 May;275(5):1289-300. PubMed PMID: 29582173. Epub 2018/03/28. eng.

44. Ishida H, Wada K, Masuda T, Okura M, Kohama K, Sano Y, et al. Critical role of estrogen receptor on anoikis and invasion of squamous cell carcinoma. *Cancer science*. 2007 May;98(5):636-43. PubMed PMID: 17355262. Epub 2007/03/16. eng.

45. Doğru MT, Başar MM, Yuvaç E, Simşek V, Sahin O. The relationship between serum sex steroid levels and heart rate variability parameters in males and the effect of

age. Turk Kardiyoloji Dernegi arsivi : Turk Kardiyoloji Derneginin yayin organidir. 2010 Oct;38(7):459-65. PubMed PMID: 21206198. Epub 2011/01/06. eng.

46. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. Journal of the National Cancer Institute. 2000 May 3;92(9):709-20. PubMed PMID: 10793107. Epub 2000/05/04. eng.

47. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology. 2006 Jun 10;24(17):2606-11. PubMed PMID: 16763272. Pubmed Central PMCID: PMC4696042. Epub 2006/06/10. eng.

48. 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. Journal of the National Cancer Institute. 2008 Feb 20;100(4):261-9. PubMed PMID: 18270337. Epub 2008/02/14. eng.

49. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. J Clin Med. 2018;7(9):241. PubMed PMID: 30150513. eng.

50. Maruyama H, Yasui T, Ishikawa-Fujiwara T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T, et al. Human papillomavirus and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma among Japanese population. Cancer science. 2014;105(4):409-17.

51. Nagase H, Woessner JF, Jr. Matrix metalloproteinases. The Journal of biological chemistry. 1999 Jul 30; 274 (31): 21491-4. PubMed PMID: 10419448. Epub 1999/07/27. eng.

52. Kessenbrock K, Wang C-Y, Werb Z. Matrix metalloproteinases in stem cell regulation and cancer. Matrix Biology. 2015 2015/05/01 /; 44-46: 184-90.

53. Gkouveris I, Nikitakis NG, Aseervatham J, Rao N, Ogbureke KUE. Matrix metalloproteinases in head and neck cancer: current perspectives. Metalloproteinases In Medicine. 2017; 4: 47-61. <https://doi.org/10.2147/MNM.S105770>

54. Bagnoli F, Oliveira VM, Silva MALG, Taromaru GCM, Rinaldi JF, Aoki T. The interaction between aromatase, metalloproteinase 2, 9 and CD44 in breast cancer. Rev. Assoc. Med. Bras. 2010;56(4):472-477. <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302010000400023>.

55. Nilsson UW, Garvin S, Dabrosin C. MMP-2 and MMP-9 activity is regulated by estradiol and tamoxifen in cultured human breast cancer cells. Breast Cancer Res Treat. 2007 May;102(3):253-61. doi: 10.1007/s10549-006-9335-4.

56. Korpi JT, Kervinen V, Mäklin H, Väänänen A, Lahtinen M, Läärä E, et al. Collagenase-2 (matrix metalloproteinase-8) plays a protective role in tongue cancer. British journal of cancer. 2008 Feb 26; 98 (4): 766-75. PubMed PMID: 18253113. Pubmed Central PMCID: PMC2259187. Epub 07/02/2008. eng.

4.2 Artigo de Revisão

Is there a role for sex hormone receptors in head-and-neck cancer? Links with HPV infection and prognosis.

(Revista Cancer Research – **Qualis A1**)

Clariano Pires de Oliveira Neto¹, Haissa Oliveira Brito¹, Rui Miguel Gil da Costa^{1, 2, 4, 6},
Luciane Maria Oliveira Brito¹

Introduction

Head-and-neck cancer comprises a group of malignancies affecting multiple sites including the oral cavity, the oropharynx, nasopharynx, hypopharynx, larynx and the salivary glands. Histologically, these lesions are most commonly squamous cell carcinomas (HNSCC) [1]. An estimated 650 000 new cases occur yearly worldwide, along with 330 000 deaths from HNSCC [2]. In the USA, HNSCC corresponds to 3% of all cancers with approximately 53 000 new cases and 10 800 deaths yearly. Males seem to be at higher risk, with a male to female ratio varying between 2:1 and 4:1 [3]. Classically, alcohol and tobacco consumption have been identified as major risk factors for developing HNSCC [4, 5]. Recently, infection with high-risk human papillomavirus (HPV) has been recognized as a risk factor for developing HNSCC [6]. HPV-positive

¹BTMA, Post-Graduate Programme in Adult Health (PPGSAD), Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil

²CITAB, University of Trás-os-Montes e Alto Douro - UTAD, Vila Real, Portugal

³Molecular Oncology and Viral Pathology Group, Portuguese Institute of Oncology in Porto Research Center (CI-IPOP), Porto, Portugal

⁴LEPABE, Chemical Engineering Department, University of Porto Faculty of Engineering (FEUP), Porto, Portugal

HNSCC is preferentially located at oropharyngeal sites, especially the tonsils and the tongue base, and shows distinguishing clinico-pathologic features [7]. Other risk factors for developing HNSCC include dietary or workplace exposure to environmental toxicants and genetic predisposition [8-10]. Between 2005 and 2014, the incidence of HPV-positive HNSCC increased by 3% while that of classical lesions decreased by 2% [11]. The increasing incidence of HPV-positive HNSCC motivated a significant effort to understand the biopathology of these lesions and adapt the current therapeutic approaches [12]. A number of markers is currently in use or under study for identifying these lesions (e.g. immunohistochemistry for p16^{INK1A}) or to predict response to specific therapies (e.g. infiltration of T lymphocytes to predict response to immune checkpoint inhibitors) [13, 14]. However, the role of hormonal receptors in HNSCC remains poorly defined.

Hormonal receptors play a major role in some malignancies like breast [15] and prostate [16] cancers and have also been implicated in HPV-driven lesions like cervical cancer [17, 18]. Multiple studies have addressed the expression patterns of hormonal receptors in HNSCC, as well as their association with HPV and their potential clinical significance, but the data concerning this subject remains dispersed and difficult to interpret. The present review brings together those data, contributing to clarify the expression patterns of hormonal receptors in HPV-positive and HPV-negative HNSCC. The contributions of hormonal receptors for the biopathology of these cancers and their potential impact on therapy are also discussed. For these purposes, PubMed-indexed research articles and reviews were retrieved and critically analyzed. Preference was given to recent literature published between 2015 and 2020, but older works were included whenever useful to define the timeline of research in this field.

HPV-positive versus HPV-negative HNSCC

Classical HNSCC is strongly associated with tobacco and alcohol consumption: data from the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium (INHANCE) show that cigarette smoking increases HNSCC risk by 50% and smoking more than 5 cigarettes per day increases HNSCC risk by over two fold [19]. Alcohol is another well-known risk factor for HNSCC, oesophageal and gastric cancer, and cooperates with tobacco to increase HNSCC risk [20-22]. Genetic polymorphisms have been suggested to increase the risk of HNSCC associated with alcohol [23]. Similarly, tobacco consumption seems to cooperate with HPV infection to increase the risk of HNSCC [24, 25]. In fact, mice transgenic for the HPV16 *E6* and *E7* oncogenes showed increased susceptibility to oral carcinogenesis induced by the tobacco-related carcinogen 4-nitroquinoline-1-oxide [26].

The connection between HPV and certain HNSCC subtypes was first pointed out twenty years ago [6]. This seminal study identified HPV in 25% of HNSCC samples and in 62% of those located in the tonsils and the tongue base, with HPV16 being most commonly found. HPV-positive tumours showed a more favourable biological behaviour compared with HPV-negative HNSCC. Over the years, these initial observations were reinforced by multiple reports from different groups and oral infection with high-risk HPV, especially HPV16, was consistently associated with increased HNSCC risk [27-29]. Studies on bovine [30], canine [31], feline [32] and murine [33] models showed the ability of papillomaviruses to infect and induce different types of lesions in the oral cavity, as previously reviewed [34-36]. More recently, our group demonstrated the ability of HPV16 to specifically induce tongue base HNSCC in transgenic mice [37], providing experimental evidence to support the etiologic role of HPV16 in this type of cancer. There are over 200 HPV types, which are

transmitted by direct contact and most often cause benign lesions [38]. The host's immune system is generally able to clear HPV infections, leading to spontaneous regression of lesions within two years as previously reviewed [39, 40]. However, some HPV types, known as high-risk HPVs (e.g. HPV16, 18 and 31) show increased ability to establish persistent infections and induce lesions that may progress towards anogenital and oropharyngeal cancers [41-43]. The carcinogenic activity of high-risk HPVs is largely attributed to their E6 and E7 oncoproteins with some less-understood contributions by the E5 oncoprotein [44, 45], as recently reviewed [46]. The E6 and E7 oncoproteins interact with two tumour suppressor proteins, p53 and the retinoblastoma protein (pRb), inducing their degradation and dysregulating key cellular functions such as proliferation, survival and DNA repair [46]. High-risk HPVs also have mechanisms to promote the immune evasion of infected cells [47, 48] and are able to interfere with the epigenetic modulation of gene expression through microRNA networks, as previously reviewed [49].

Histologically, HPV-positive HNSCC tends to be less differentiated than HPV-negative tumours [50]. Since the beginning of the XXI century, the incidence of HPV-positive HNSCC has been steadily increasing while that of HPV-negative HNSCC decreased a trend that is speculated to be caused by changing sexual habits [51]. HPV-positive tumours tend to respond better to therapy [52-54] and specific therapeutic modalities, including de-escalation of aggressive chemo-radiation treatment, are currently under study [11, 55, 56].

Hormone receptors in HNSCC

The role of hormone receptors is well characterized in several types of cancer. This is particularly true in the case of sex hormone (estrogen, androgen, progesterone)

receptors in malignancies like breast cancer [15, 57] and prostate cancer [16], where the expression of sex hormone receptors is critical to define tumour subtypes with distinguishing biopathological characteristics and different responses to therapy. The use of hormonal therapies for treating androgen-dependent prostate cancer (e.g. enzalutamide) and some types of breast cancer (e.g. tamoxifen) is well established [58-60].

Androgen receptors (AR) were detected in the normal oral mucosa using immunohistochemistry on frozen samples [61]. More recently, [62] reported low levels of AR expression in only a minority of laryngeal samples. The same authors reported similar results concerning the expression of prolactin receptors in the normal laryngeal mucosa. There are two types of oestrogen receptors commonly located in the cell nucleus, the well-known alpha and beta ($ER\alpha$ and $ER\beta$), located in the cell nucleus [63] in contrast, the G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) is associated with the cell membrane rather than the nucleus and triggers a number non-genomic effects [64]. Although GPER has been implicated in some types of cancer [65], its role is not so well characterized as that of $ER\alpha$ and $ER\beta$. Initial studies performed in the 1980s showed conflicting results regarding the expression of ER or the progesterone receptor in the laryngeal mucosa [66, 67]. In the early 2000s, Valimaa et al. reported that the normal oral mucosa and salivary glands express $ER\beta$ [68] but another study using paraffin-embedded samples from a small patient cohort ($n=5$) reported that the oral mucosa was negative for $ER\alpha$ and progesterone receptors [69]. Lukits et al., using frozen and paraffin-embedded samples from 10 patients obtained different results. When analyzing frozen samples, both the oral mucosa and the glottis were positive for $ER\alpha$, $ER\beta$ and progesterone receptors on the mRNA level. Using immunofluorescence techniques, the authors observed expression of $ER\alpha$ on the oral and glottic mucosa while $ER\beta$ was more

abundant in the glandular epithelium [70]. These findings suggest that the methods for studying the expression of those markers in the oropharyngeal cavity need to be standardized, especially the use of frozen versus paraffin-embedded material and the immunohistochemical techniques employed. Due to the complexity of the oropharyngeal and laryngeal cavities, it is also possible that specific anatomic areas (e.g. larynx versus tongue) express some hormone receptors while others do not.

The expression patterns of sex hormone receptors in HNSCC is also unclear, which is unsurprising considering these difficulties and the heterogeneity of these tumours. Androgen receptor was found to be expressed in salivary gland duct carcinomas and other non-squamous head and neck cancers, as recently reviewed [71]. The present review will focus on data concerning HNSCC.

An initial study performed in 1984 using a dextran-coated charcoal method for determining oestrogen and progesterone receptors in HNSCC samples found ER in only 2 out of 75 samples and no progesterone receptors [66]. Virolainen et al. (1986) detected AR, ER and PR in 31%, 69% and 35% respectively of frozen laryngeal SCC samples, using hormone binding assays [72]. In contrast, Ferguson et al. (1987) using immunohistochemistry on frozen samples reported that neither ER nor PR were expressed by laryngeal carcinomas [67]. Twenty years later, Lukits et al. studied the expression of progesterone receptors (PR), and the two distinct estrogen receptors, ER α and ER β in 67 frozen oral, laryngeal and hypopharyngeal SCC samples at the mRNA and protein levels [70]. The authors observed that all three receptors were expressed by epithelial cells in these cancers and that ER α was more frequently expressed than ER β . These two receptors were expressed in their wild-type form or as splice variants $\delta 3$ and $\delta 5$ for ER α and ER β , respectively. Most lesions expressed both ER and PR (41.8% of lesions), rather than ER or PR alone (8.9%). Almost 10 years later, another study

compared the expression on the progesterone receptor (PR) and ER α in male and female patients and in normal oral mucosa, intraepithelial lesions and oral SCC, and only observed expression of ER α in 11% of intraepithelial lesions and SCCs [69]. In the same year, Grsic et al. (2016) studied the expression of ER β in a larger cohort (174 patients, 165 of which were male). Interestingly, this study showed ER β expression in 42% of patients [73]. Most negative tumours were laryngeal primaries ($p=0.04$), and the expression of ER β was consistently higher in tumours from other sites (oral cavity, hypopharynx, oropharynx) without further anatomy-related differences. Another study found that 16% of oropharyngeal cancers expressed AR, 27% expressed PR and 63% expressed ER β , while ER α expression was not detected [74]. In contrast, Kano et al. (2019) detected both ER α and ER β in 29% and 36% of oropharyngeal cancer samples, respectively. [75]. Table 3 summarizes data on the expression of sex hormone receptors in HNSCC.

Table 3. Expression of sex hormone receptors in HNSCC.

Hormone receptor	Positivity	Sample	Method	References
AR	8/21	Laryngeal SCC, frozen	HBA	Virolainen et al. 1986 [72]
	31/199	OPSCC, FFPE	IHC	Mohamed et al. 2018 [74]
PR	None	Normal larynx, frozen	IHC	Ferguson et al. 1987 [67]
	None	Laryngeal SCC, frozen	IHC	Ferguson et al. 1987 [67]
	None	Oral CSS, FFPE	IHC	Grimm et al. 2016 [69]
	21/43	Laryngeal and hypopharyngeal SCC, frozen	IHC	Lukits et al. 2007 [70]
	8/15	Laryngeal SCC, frozen	HBA	Virolainen et al. 1986 [72]
	54/199	OPSCC, FFPE	IHC	Mohamed et al. 2018 [74]
ER α	5/46	Oral SCC, FFPE	IHC	Grimm et al. 2016 [69]
	16/43	Laryngeal and hypopharyngeal SCC, frozen	IHC	Lukits et al. 2007 [70]
	None	OPSCC, FFPE	IHC	Mohamed et al. 2018 [74]
	19/68	OPSCC, FFPE	IHC	Kano et al. 2019 [75]
ER β	73/174	Larynx, oral cavity, hypopharynx, oropharynx SCC, FFPE	IHC	Grsic et al. 2016 [73]
	11/43	Laryngeal and hypopharyngeal SCC, frozen	IHC	Lukits et al. 2007 [70]
	126/199	OPSCC, FFPE	IHC	Mohamed et al. 2018 [74]
	23/64	OPSCC, FFPE	IHC	Kano et al. 2019 [75]

IHC- immunohistochemistry, FFPE- formalin-fixed paraffin embedded, HBA- hormone binding assays

HPV and hormonal receptors

Mohamed et al. (2018) observed a correlation between HPV-positive tumours with increased expression of AR and reduced expression of PR ($p < 0.001$ for both markers). Kano et al, (2019) reported that ER α expression is associated with HPV-positive oropharyngeal cancers ($p = 0.018$ versus HPV-negative) and suggest that ER α facilitates the integration of HPV DNA into the host's genome by promoting DNA hypermutation through the apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide 3 (APOBEC3). In fact, HPV-positive HNSCC has a specific mutational landscape associated with APOBEC, as previously described [76]. In the cervical transformation zone, estrogen exposure promotes neoplastic transformation and the development of cervical cancer induced by HPV16 [17, 18]. In 35% of cervical cancers, expression of aromatase, the rate-limiting enzyme involved oestrogen synthesis, is up-regulated compared to normal cervical mucosa and to precancerous lesions [77]. Aromatase expression was associated with increased expression of ER α /ER β and reduced PR expression, as well as with up-regulation of HPV oncogenes E6 and E7 and increased cell proliferation.

Overall, it is possible that estrogen signaling via ER α and/or ER β plays a significant role in HPV-positive HNSCC, namely by promoting viral integration into the host cell's genome, as observed in cervical cancer (**Figure 1**). Additional evidence is needed to define the possible role of other hormone receptors such as AR and PR.

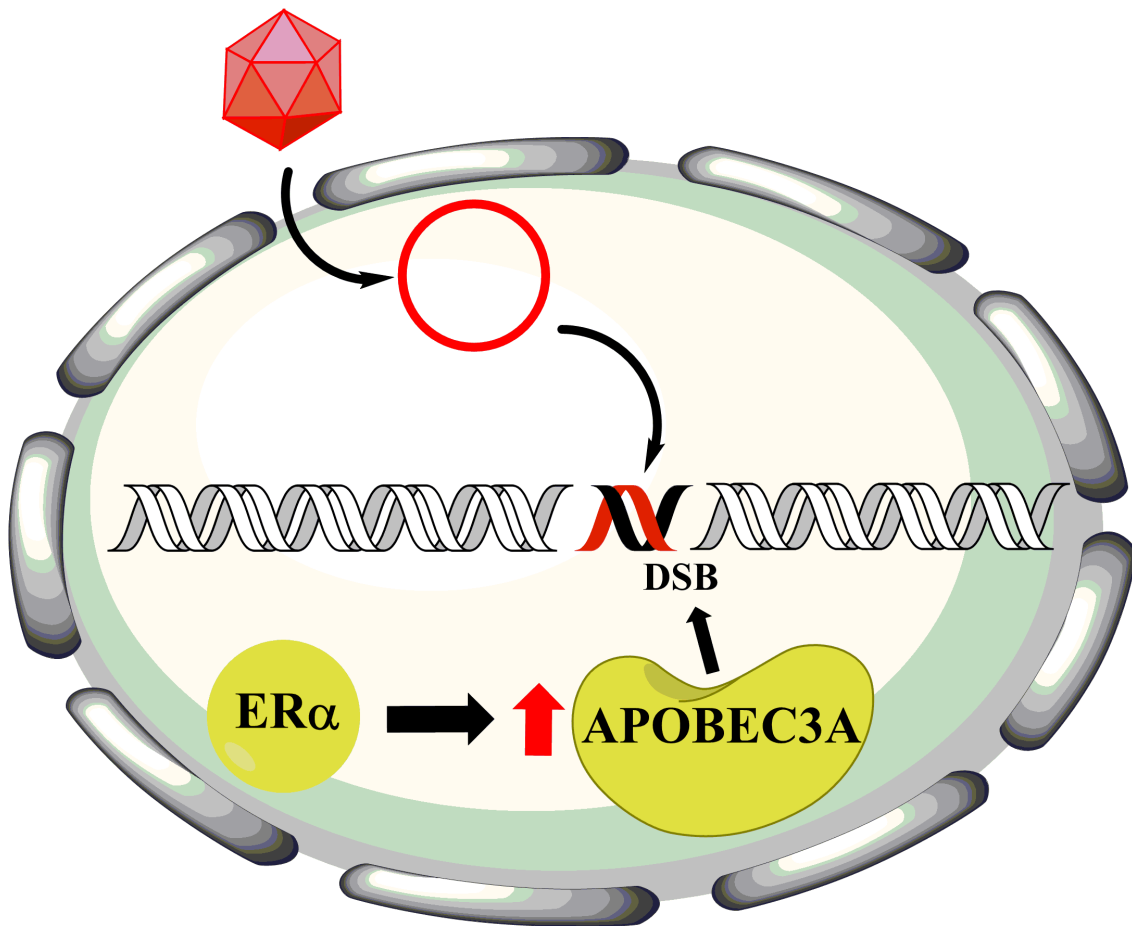


Figure 16 A possible association between ER α and HPV-positive HNSCC, as proposed by Kano et al, (2019). Estrogen receptor alpha (ER α) up-regulates the apolipoprotein B mRNA-editing catalytic polypeptide 3 (APOBEC3), inducing DNA double-strand breaks which facilitate the integration of HPV DNA into the host cell's genome

Therapeutic and prognostic relevance of hormone receptors in HNSCC

The clinical significance of sex hormone receptors in HNSCC has been addressed by multiple recent studies and pre-clinical studies of hormonal therapy have been attempted with limited success. As mentioned in the previous section, AR expression is associated with HPV infection in HNSCC [74]. Interestingly, AR up-regulation was correlated with reduced survival ($p < 0.005$) in HNSCC patients and was found to be driven by microRNA-21 [78]. Concerning female sex hormone receptors, Lukits et al. (2007) did not find any significant associations between the expression of PR, ER α or ER β and patient prognosis. However, PR expression was associated with

reduced disease-specific survival ($p=0.001$) by a recent study [74]. Egloff et al. (2009) suggested the existence of a cross-talk between ER α and the epidermal growth factor receptor (EGFR) in HNSCC and showed that the simultaneous expression of both receptors significantly reduced progression-free survival compared with tumours with only one of those receptors (hazard ratio 4.09, $p=0.01$). Interestingly, this was not observed for ER β . In line with these observations, the authors also showed that a combined *in vitro* treatment of HNSCC cells with estradiol and EGF significantly increased cell invasion, compared with treatments with each single ligand [79]. Lin et al. (2011) also reported that ER α cooperates with EGFR to promote chemoresistance of HNSCC cell lines *in vitro* [80]. The authors reported that ER α up-regulates the anti-apoptotic protein B cell lymphoma 2 (Bcl-2) and rescues EGFR levels, promoting survival and proliferation (**Figure 2**). Early *in vivo* trials of anti-oestrogen therapies against cervical cancer in HPV-transgenic mouse models [81, 82] showed positive results. Trials of tamoxifen against HNSCC [83] allowed researchers to overcome cisplatin resistance *in vitro*. However, the mechanism of action of tamoxifen in ER-negative HNSCC cell lines remains unclear [84]. If a rationale for hormonal therapy in HNSCC is to be found the role of hormonal receptors in this type of cancer needs to be clarified.

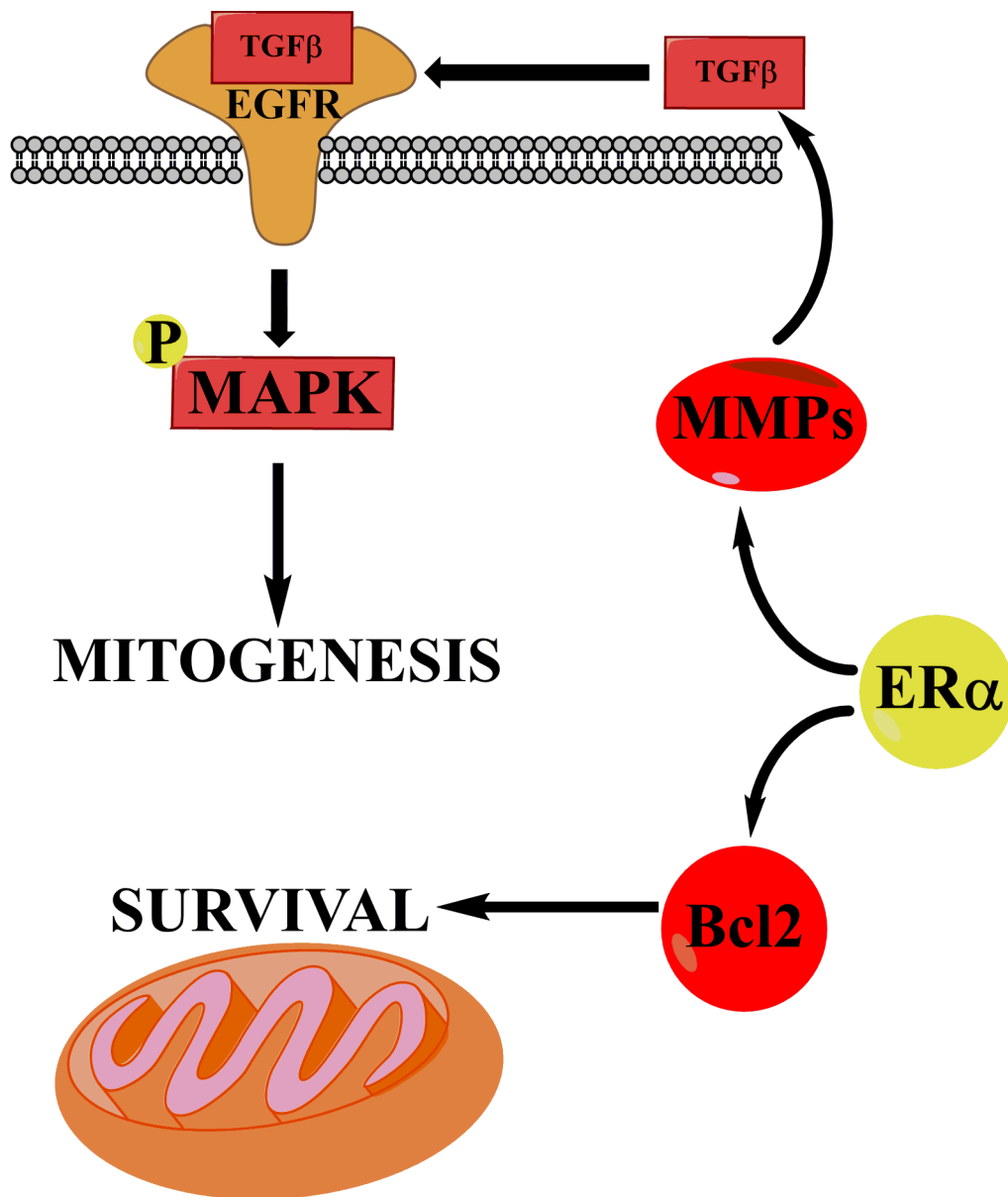


Figure 17 The estrogen receptor alpha (ER α) was proposed to activate multiple signaling pathways leading to cell survival and proliferation. Up-regulation of B-cell lymphoma 2 (Bcl2) blocks the mitochondrial apoptotic pathway. The release of ligands for the epithelial growth factor receptor (EGFR) via matrix metalloproteinases activates leads to the phosphorylation of mitogen-activated protein kinase (MAPK) and drives cell proliferation.

Interestingly, ER α was associated with improved overall survival in patients with HPV-positive oropharyngeal cancer ($p=0.029$) [75], possibly because the APOBEC mutational signature of these tumors makes them more immunogenic. More

recently, Grsic et al (2016) reported that ER β expression in oropharyngeal cancer correlated with improved 5 years survival (35% versus 25% in patients with ER β -negative cancers, $p=0.045$). The same was not observed in other anatomic sites. The HPV status of these tumours was not reported and may have been a confounding variable in this study. Grunow et al. (2017) made additional and more complex observations on the role of ER β . Radiotherapy-treated oropharyngeal cancers expressing ER β showed higher progression-free survival ($p=0.002$) and disease-specific survival ($p=0.01$), compared with negative cases. However, the authors also observed that ER β up-regulated the submaxillary gland androgen-regulated protein 3A (SMR3A) and promoted the resistance to radiation therapy *in vitro* [85]. Tumours expressing both ER β and SMR3A had poor prognosis, similar to the ER β -negative subgroup. These observations suggest that ER β activates multiple pathways in HNSCC and may either play a protective role or, on the contrary, promote radio-resistance. The membrane associated GPER has also been implicated in laryngeal cancer, even if only by an *in vitro* study [86]. GPER was shown to up-regulate interleukin-6 expression in response to bisphenol A *in vitro*, increasing cell proliferation and invasion.

Overall, sex hormone receptors seem to influence the biopathology of HNSCC mainly by promoting DNA hypermutation and facilitating HPV integration or by cooperating with EGFR in the case of ER α . The role of ER β seems to be more complex and requires additional investigation. The expression of sex hormone receptors may be of prognostic value, if studied in the right tumour subgroups. The use of these receptors as therapeutic targets is still not in close sight. However, it is tempting to speculate that HNSCC subgroups may benefit from combination therapies of hormone receptor modulators with anti-EGFR drugs (e.g. erlotinib).

References

1. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. CA: a cancer journal for clinicians. 2017;67(2):122-37. doi:10.3322/caac.21389.
2. 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: a cancer journal for clinicians. 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. CA: a cancer journal for clinicians. 2019;69(1):7-34. doi:10.3322/caac.21551.
4. 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. American journal of epidemiology. 2013;178(5):679-90. doi:10.1093/aje/kwt029.
5. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. Journal of the National Cancer Institute. 2007;99(10):777-89. doi:10.1093/jnci/djk179.
6. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. Journal of the National Cancer Institute. 2000;92(9):709-20. doi:10.1093/jnci/92.9.709.
7. Ramqvist T, Grun N, Dalianis T. Human papillomavirus and tonsillar and base of tongue cancer. Viruses. 2015;7(3):1332-43. doi:10.3390/v7031332.
8. Cohen N, Fedewa S, Chen AY. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. Oral and maxillofacial surgery clinics of North America. 2018;30(4):381-95. doi:10.1016/j.coms.2018.06.001.
9. Cardin GB, Bernard M, Bahig H, Nguyen-Tan PF, Ballivy O, Filion E et al. Single Nucleotide Polymorphism rs6942067 Is a Risk Factor in Young and in Non-Smoking Patients with HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. Cancers. 2019;12(1). doi:10.3390/cancers12010055.
10. Liu C, Sadat SH, Ebisumoto K, Sakai A, Panuganti BA, Ren S et al. Cannabinoids promote progression of HPV positive head and neck squamous cell carcinoma via p38 MAPK activation. Clinical Cancer Research. 2020;clincanres.3301.2018. doi:10.1158/1078-0432.ccr-18-3301.
11. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse SF. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014. National Cancer Institute. 2017.
12. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. International journal of cancer. 2017;141(4):664-70. doi:10.1002/ijc.30716.

13. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature reviews Cancer*. 2018;18(5):269-82. doi:10.1038/nrc.2018.11.
14. de la Iglesia JV, Slebos RJ, Martin-Gomez L, Wang X, Teer JK, Tan AC et al. Effects of tobacco smoking on the tumor immune microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019. doi:10.1158/1078-0432.ccr-19-1769.
15. Harbeck N, Penault-Llorca F, Cortes J, Gnant M, Houssami N, Poortmans P et al. Breast cancer. *Nature reviews Disease primers*. 2019;5(1):66. doi:10.1038/s41572-019-0111-2.
16. Labrecque MP, Coleman IM, Brown LG, True LD, Kollath L, Lakely B et al. Molecular profiling stratifies diverse phenotypes of treatment-refractory metastatic castration-resistant prostate cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2019;130:4492-505. doi:10.1172/jci128212.
17. Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(7):2930-5. doi:10.1073/pnas.93.7.2930.
18. Brake T, Lambert PF. Estrogen contributes to the onset, persistence, and malignant progression of cervical cancer in a human papillomavirus-transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(7):2490-5. doi:10.1073/pnas.0409883102.
19. Berthiller J, Straif K, Agudo A, Ahrens W, Bezerra Dos Santos A, Boccia S et al. Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis. *International journal of epidemiology*. 2016;45(3):835-45. doi:10.1093/ije/dyv146.
20. Goldstein BY, Chang SC, Hashibe M, La Vecchia C, Zhang ZF. Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 2010;19(6):431-65. doi:10.1097/CEJ.0b013e32833d936d.
21. Boeing H. Alcohol and risk of cancer of the upper gastrointestinal tract: first analysis of the EPIC data. *IARC scientific publications*. 2002;156:151-4.
22. IARC. Alcohol drinking. IARC Working Group, Lyon, 13-20 October 1987. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1988;44:1-378.
23. Koch WM, McQuone S. Clinical and molecular aspects of squamous cell carcinoma of the head and neck in the nonsmoker and nondrinker. *Current opinion in oncology*. 1997;9(3):257-61. doi:10.1097/00001622-199709030-00007.
24. Chaturvedi AK, D'Souza G, Gillison ML, Katki HA. Burden of HPV-positive oropharynx cancers among ever and never smokers in the U.S. population. *Oral oncology*. 2016;60:61-7. doi:10.1016/j.oraloncology.2016.06.006.
25. Liu L, Wu G, Xue F, Li Y, Shi J, Han J et al. Functional *CYP1A1* genetic variants, alone and in combination with smoking, contribute to development of

- head and neck cancers. *European Journal of Cancer*. 2013;49(9):2143-51. doi:10.1016/j.ejca.2013.01.028.
26. Jabbar S, Strati K, Shin MK, Pitot HC, Lambert PF. Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins act synergistically to cause head and neck cancer in mice. *Virology*. 2010;407(1):60-7. doi:10.1016/j.virol.2010.08.003.
27. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;356(19):1944-56. doi:10.1056/NEJMoa065497.
28. 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. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(23):1772-83. doi:10.1093/jnci/djg107.
29. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH et al. Human papillomavirus in oral exfoliated cells and risk of head and neck cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(6):449-55. doi:10.1093/jnci/djh074.
30. Zhu W, Dong J, Shimizu E, Hatama S, Kadota K, Goto Y et al. Characterization of novel bovine papillomavirus type 12 (BPV-12) causing epithelial papilloma. *Archives of virology*. 2012;157(1):85-91. doi:10.1007/s00705-011-1140-7.
31. Munday JS, Dunowska M, Laurie RE, Hills S. Genomic characterisation of canine papillomavirus type 17, a possible rare cause of canine oral squamous cell carcinoma. *Veterinary microbiology*. 2016;182:135-40. doi:10.1016/j.vetmic.2015.11.015.
32. Chu S, Wylie TN, Wylie KM, Johnson GC, Skidmore ZL, Flier M et al. A virome sequencing approach to feline oral squamous cell carcinoma to evaluate viral causative factors. *Veterinary microbiology*. 2020;240:108491. doi:10.1016/j.vetmic.2019.108491.
33. Cladel NM, Budgeon LR, Balogh KK, Cooper TK, Brendle SA, Christensen ND et al. Mouse papillomavirus infection persists in mucosal tissues of an immunocompetent mouse strain and progresses to cancer. *Scientific reports*. 2017;7(1):16932. doi:10.1038/s41598-017-17089-4.
34. Gil da Costa RM, Peleteiro MC, Pires MA, DiMaio D. An Update on Canine, Feline and Bovine Papillomaviruses. *Transboundary and emerging diseases*. 2017;64(5):1371-9. doi:10.1111/tbed.12555.
35. Gil da Costa RM, Medeiros R. Bovine papillomavirus: opening new trends for comparative pathology. *Archives of virology*. 2014;159(2):191-8. doi:10.1007/s00705-013-1801-9.
36. Santos C, Vilanova M, Medeiros R, Gil da Costa RM. HPV-transgenic mouse models: Tools for studying the cancer-associated immune response. *Virus research*. 2017;235:49-57. doi:10.1016/j.virusres.2017.04.001.
37. Mestre VF, Medeiros-Fonseca B, Estêvão D, Casaca F, Silva S, Félix A et al. HPV16 is sufficient to induce squamous cell carcinoma specifically in the tongue base in transgenic mice. *Journal of Pathology*. 2020;(in press) doi:10.1002/path.5387.

38. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews*. 2003;16(1):1-17. doi:10.1128/cmr.16.1.1-17.2003.
39. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, Powell K, Clayton L, Jay N et al. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *The Journal of pediatrics*. 1998;132(2):277-84. doi:10.1016/s0022-3476(98)70445-7.
40. Egawa N, Egawa K, Griffin H, Doorbar J. Human Papillomaviruses; Epithelial Tropisms, and the Development of Neoplasia. *Viruses*. 2015;7(7):3863-90. doi:10.3390/v7072802.
41. IARC. Human papillomaviruses. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 2007;90:1-636.
42. de Villiers EM. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology*. 2013;445(1-2):2-10. doi:10.1016/j.virol.2013.04.023.
43. Bzhalava D, Eklund C, Dillner J. International standardization and classification of human papillomavirus types. *Virology*. 2015;476:341-4. doi:10.1016/j.virol.2014.12.028.
44. Gupta S, Kumar P, Das BC. HPV: Molecular pathways and targets. *Current problems in cancer*. 2018;42(2):161-74. doi:10.1016/j.crrproblcancer.2018.03.003.
45. Ilahi NE, Bhatti A. Impact of HPV E5 on viral life cycle via EGFR signaling. *Microbial pathogenesis*. 2019;139:103923. doi:10.1016/j.micpath.2019.103923.
46. Estevao D, Costa NR, Gil da Costa RM, Medeiros R. Hallmarks of HPV carcinogenesis: The role of E6, E7 and E5 oncoproteins in cellular malignancy. *Biochimica et biophysica acta Gene regulatory mechanisms*. 2019;1862(2):153-62. doi:10.1016/j.bbagr.2019.01.001.
47. Steinbach A, Riemer AB. Immune evasion mechanisms of human papillomavirus: An update. *International journal of cancer*. 2018;142(2):224-9. doi:10.1002/ijc.31027.
48. Kwon MJ, Rho YS, Nam ES, Cho SJ, Park HR, Min SK et al. Clinical implication of programmed cell death-1 ligand-1 expression in tonsillar squamous cell carcinoma in association with intratumoral heterogeneity, human papillomavirus, and epithelial-to-mesenchymal transition. *Human pathology*. 2018;80:28-39. doi:10.1016/j.humpath.2018.03.025.
49. Santos JMO, Peixoto da Silva S, Costa NR, Gil da Costa RM, Medeiros R. The Role of MicroRNAs in the Metastatic Process of High-Risk HPV-Induced Cancers. *Cancers*. 2018;10(12). doi:10.3390/cancers10120493.
50. El-Mofty SK. Human papillomavirus-related head and neck squamous cell carcinoma variants. *Seminars in diagnostic pathology*. 2015;32(1):23-31. doi:10.1053/j.semdp.2015.02.022.
51. Herbenick D, Reece M, Schick V, Sanders SA, Dodge B, Fortenberry JD. Sexual behavior in the United States: results from a national probability sample of men and women ages 14-94. *The journal of sexual medicine*. 2010;7 Suppl 5:255-65. doi:10.1111/j.1743-6109.2010.02012.x.

52. Gleber-Netto FO, Rao X, Guo T, Xi Y, Gao M, Shen L et al. Variations in HPV function are associated with survival in squamous cell carcinoma. *JCI insight*. 2019;4(1). doi:10.1172/jci.insight.124762.
53. Mehanna H, Robinson M, Hartley A, Kong A, Foran B, Fulton-Lieuw T et al. Radiotherapy plus cisplatin or cetuximab in low-risk human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer (De-ESCALaTE HPV): an open-label randomised controlled phase 3 trial. *Lancet (London, England)*. 2019;393(10166):51-60. doi:10.1016/s0140-6736(18)32752-1.
54. Koneva LA, Zhang Y, Virani S, Hall PB, McHugh JB, Chepeha DB et al. HPV Integration in HNSCC Correlates with Survival Outcomes, Immune Response Signatures, and Candidate Drivers. *Molecular cancer research : MCR*. 2018;16(1):90-102. doi:10.1158/1541-7786.mcr-17-0153.
55. Lee JW, Parameswaran J, Sandoval-Schaefer T, Eoh KJ, Yang D-H, Zhu F et al. Combined Aurora Kinase A (AURKA) and WEE1 Inhibition Demonstrates Synergistic Antitumor Effect in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2019;25(11):3430-42. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0440.
56. 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. doi:10.1200/jco.19.01007.
57. Alvarado A, Gil da Costa RM, Faustino-Rocha AI, Ferreira R, Lopes C, Oliveira PA et al. Effects of exercise training on breast cancer metastasis in a rat model. *International journal of experimental pathology*. 2017;98(1):40-6. doi:10.1111/iep.12225.
58. Nyquist MD, Corella A, Mohamad O, Coleman I, Kaipainen A, Kupperts DA et al. Molecular determinants of response to high-dose androgen therapy in prostate cancer. *JCI insight*. 2019;4(19):e129715. doi:10.1172/jci.insight.129715.
59. Gao S, Ye H, Gerrin S, Wang H, Sharma A, Chen S et al. ErbB2 Signaling Increases Androgen Receptor Expression in Abiraterone-Resistant Prostate Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22(14):3672-82. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2309.
60. Howell A, Cuzick J, Baum M, Buzdar A, Dowsett M, Forbes JF et al. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet (London, England)*. 2005;365(9453):60-2. doi:10.1016/s0140-6736(04)17666-6.
61. Ojanotko-Harri A, Forssell H, Laine M, Hurttia H, Blauer M, Tuohimaa P. Immunohistochemical detection of androgen receptors in human oral mucosa. *Archives of oral biology*. 1992;37(6):511-4. doi:10.1016/0003-9969(92)90108-k.
62. Fei M, Zhang J, Zhou J, Xu Y, Wang J. Sex-related hormone receptor in laryngeal squamous cell carcinoma: correlation with androgen estrogen-a and prolactin receptor

expression and influence of prognosis. *Acta oto-laryngologica*. 2018;138(1):66-72. doi:10.1080/00016489.2017.1373851.

63. Hewitt SC, Korach KS. Estrogen Receptors: New Directions in the New Millennium. *Endocrine reviews*. 2018;39(5):664-75. doi:10.1210/er.2018-00087.

64. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, NY)*. 2005;307(5715):1625-30. doi:10.1126/science.1106943.

65. Zhou X, Wang S, Wang Z, Feng X, Liu P, Lv XB et al. Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(5):2123-35. doi:10.1172/jci79573.

66. Schuller DE, Abou-Issa H, Parrish R. Estrogen and progesterone receptors in head and neck cancer. *Archives of otolaryngology (Chicago, Ill : 1960)*. 1984;110(11):725-7. doi:10.1001/archotol.1984.00800370027006.

67. Ferguson BJ, Hudson WR, McCarty KS, Jr. Sex steroid receptor distribution in the human larynx and laryngeal carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 1987;113(12):1311-5. doi:10.1001/archotol.1987.01860120057008.

68. Valimaa H, Savolainen S, Soukka T, Silvoniemi P, Makela S, Kujari H et al. Estrogen receptor-beta is the predominant estrogen receptor subtype in human oral epithelium and salivary glands. *The Journal of endocrinology*. 2004;180(1):55-62. doi:10.1677/joe.0.1800055.

69. Grimm M, Biegner T, Teriete P, Hoefert S, Krimmel M, Munz A et al. Estrogen and Progesterone hormone receptor expression in oral cavity cancer. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2016;21(5):e554-8. doi:10.4317/medoral.21182.

70. Lukits J, Remenar E, Raso E, Ladanyi A, Kasler M, Timar J. Molecular identification, expression and prognostic role of estrogen- and progesterone receptors in head and neck cancer. *International journal of oncology*. 2007;30(1):155-60. doi:10.3892/ijo.30.1.155.

71. Yeoh CC, Dabab N, Rigby E, Chhikara R, Akaev I, Gomez RS et al. Androgen receptor in salivary gland carcinoma: A review of an old marker as a possible new target. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2018;47(7):691-5. doi:10.1111/jop.12741.

72. Virolainen E, Tuohimaa P, Aitasalo K, Kytta J, Vanharanta-Hiltunen R. Steroid hormone receptors in laryngeal carcinoma. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 1986;94(4):512-7. doi:10.1177/019459988609400419.

73. Grsic K, Opacic IL, Sitic S, Milkovic Perisa M, Suton P, Sarcevic B. The prognostic significance of estrogen receptor beta in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology letters*. 2016;12(5):3861-5. doi:10.3892/ol.2016.5142.

74. Mohamed H, Aro K, Jouhi L, Makitie A, Remes S, Haglund C et al. Expression of hormone receptors in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-*

Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery. 2018;275(5):1289-300. doi:10.1007/s00405-018-4949-9.

75. Kano M, Kondo S, Wakisaka N, Wakae K, Aga M, Moriyama-Kita M et al. Expression of estrogen receptor alpha is associated with pathogenesis and prognosis of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer. *International journal of cancer*. 2019;145(6):1547-57. doi:10.1002/ijc.32500.

76. Hayes DN, Van Waes C, Seiwert TY. Genetic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer and Comparison to Tobacco-Related Tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(29):3227-34. doi:10.1200/jco.2015.62.1086.

77. Nair HB, Luthra R, Kirma N, Liu YG, Flowers L, Evans D et al. Induction of aromatase expression in cervical carcinomas: effects of endogenous estrogen on cervical cancer cell proliferation. *Cancer research*. 2005;65(23):11164-73. doi:10.1158/0008-5472.can-05-1087.

78. Lubov J, Maschietto M, Ibrahim I, Mlynarek A, Hier M, Kowalski LP et al. Meta-analysis of microRNAs expression in head and neck cancer: uncovering association with outcome and mechanisms. *Oncotarget*. 2017;8(33):55511-24. doi:10.18632/oncotarget.19224.

79. Egloff AM, Rothstein ME, Seethala R, Siegfried JM, Grandis JR, Stabile LP. Cross-talk between estrogen receptor and epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(21):6529-40. doi:10.1158/1078-0432.ccr-09-0862.

80. Lin YC, Wu MH, Wei TT, Chuang SH, Chen KF, Cheng AL et al. Degradation of epidermal growth factor receptor mediates dasatinib-induced apoptosis in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Neoplasia (New York, NY)*. 2012;14(6):463-75. doi:10.1596/neo.12300.

81. Jin L, Qi M, Chen DZ, Anderson A, Yang GY, Arbeit JM et al. Indole-3-carbinol prevents cervical cancer in human papilloma virus type 16 (HPV16) transgenic mice. *Cancer research*. 1999;59(16):3991-7.

82. Sepkovic DW, Stein J, Carlisle AD, Ksieski HB, Auburn K, Bradlow HL. Diindolylmethane inhibits cervical dysplasia, alters estrogen metabolism, and enhances immune response in the K14-HPV16 transgenic mouse model. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(11):2957-64. doi:10.1158/1055-9965.epi-09-0698.

83. Tavassoli M, Soltaninia J, Rudnicka J, Mashanyare D, Johnson N, Gaken J. Tamoxifen inhibits the growth of head and neck cancer cells and sensitizes these cells to cisplatin induced-apoptosis: role of TGF-beta1. *Carcinogenesis*. 2002;23(10):1569-75. doi:10.1093/carcin/23.10.1569.

84. Hoffmann TK, Bojar H, Eckel J, van Lierop A, Balz V, Friebe-Hoffmann U et al. Effects of tamoxifen on human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. *Anti-cancer drugs*. 2002;13(5):521-31. doi:10.1097/00001813-200206000-00011.
85. Grunow J, Rong C, Hischmann J, Zaoui K, Flechtenmacher C, Weber KJ et al. Regulation of submaxillary gland androgen-regulated protein 3A via estrogen receptor 2 in radioresistant head and neck squamous cell carcinoma cells. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR*. 2017;36(1):25. doi:10.1186/s13046-017-0496-2.
86. Li S, Wang B, Tang Q, Liu J, Yang X. Bisphenol A triggers proliferation and migration of laryngeal squamous cell carcinoma via GPER mediated upregulation of IL-6. *Cell biochemistry and function*. 2017;35(4):209-16. doi:10.1002/cbf.3265.

REFERÊNCIAS

1. Dürst M, Gissmann L, Ikenberg H, zur Hausen H. A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1983 Jun;80(12):3812-5. PubMed PMID: 6304740. Pubmed Central PMCID: PMC394142. Epub 1983/06/01. eng.
2. Sehnal B, Zikan M, Nipcova M, Dusek L, Cibula D, Slama J. The association among cervical, anal, and oral HPV infections in high-risk and low-risk women. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*: X. 2019 2019/10/01;4:100061.
3. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2005 Feb;14(2):467-75. PubMed PMID: 15734974. Epub 2005/03/01. eng.
4. Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The Epidemiology and Risk Factors of Head and Neck Cancer: a Focus on Human Papillomavirus. *Journal of Dental Research*. 2007 2007/02/01;86(2):104-14.
5. 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 Mar 19;100(6):407-20. PubMed PMID: 18334711. Epub 2008/03/13. eng.
6. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2009 May 1;199(9):1263-9. PubMed PMID: 19320589. Pubmed Central PMCID: PMC4703086. Epub 2009/03/27. eng.
7. Thompson LDR. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear, Nose and Throat Journal*. 2006 2006/02//:74.
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017 Jan;67(1):7-30. PubMed PMID: 28055103. Epub 2017/01/06. eng.
9. Vogel VG. Role of hormones in cancer prevention. *American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Annual Meeting*. 2014:34-40. PubMed PMID: 24857058. Epub 2014/05/27. eng.
10. Mohamed H, Aro K, Jouhi L, Mäkitie A, Remes S, Haglund C, et al. Expression of hormone receptors in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery*. 2018 May;275(5):1289-300. PubMed PMID: 29582173. Epub 2018/03/28. eng.

11. Grimm M, Biegner T, Teriete P, Hoefert S, Krimmel M, Munz A, et al. Estrogen and Progesterone hormone receptor expression in oral cavity cancer. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016;21(5):e554-e8. PubMed PMID: 27475696. eng.
12. Lukits J, Remenár E, Rásó E, Ladányi A, Kásler M, Tímár J. Molecular identification, expression and prognostic role of estrogen- and progesterone receptors in head and neck cancer. *International journal of oncology*. 2007 Jan;30(1):155-60. PubMed PMID: 17143524. Epub 2006/12/05. eng.
13. Kano M, Kondo S, Wakisaka N, Wakae K, Aga M, Moriyama-Kita M, et al. Expression of estrogen receptor alpha is associated with pathogenesis and prognosis of human papillomavirus-positive oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*. 2019 Sep 15;145(6):1547-57. PubMed PMID: 31228270. Epub 2019/06/23. eng.
14. Grsic K, Opacic IL, Sitic S, Milkovic Perisa M, Suton P, Sarcevic B. The prognostic significance of estrogen receptor β in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Lett*. 2016;12(5):3861-5. PubMed PMID: 27895741. Epub 09/15. eng.
15. Lydiatt WM, Patel SG, O'Sullivan B, Brandwein MS, Ridge JA, Migliacci JC, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017 Mar;67(2):122-37. PubMed PMID: 28128848. Epub 2017/01/28. eng.
16. 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: a cancer journal for clinicians*. 2018 Nov;68(6):394-424. PubMed PMID: 30207593. Epub 2018/09/13. eng.
17. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2019 Jan;69(1):7-34. PubMed PMID: 30620402. Epub 2019/01/09. eng.
18. Beynon RA, Lang S, Schimansky S, Penfold CM, Waylen A, Thomas SJ, et al. Tobacco smoking and alcohol drinking at diagnosis of head and neck cancer and all-cause mortality: Results from head and neck 5000, a prospective observational cohort of people with head and neck cancer. *International journal of cancer*. 2018;143(5):1114-27. PubMed PMID: 29607493. Epub 04/23. eng.
19. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med*. 2018;7(9):241. PubMed PMID: 30150513. eng.
20. Cohen N, Fedewa S, Chen AY. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2018 Nov;30(4):381-95. PubMed PMID: 30078696. Epub 2018/08/07. eng.
21. Howlader N, Noone A, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Altekruse S, et al. SEER cancer statistics review, 1975–2013. Bethesda, MD: National Cancer Institute. 2016;19.
22. Organization WH. WHO report on the global tobacco epidemic, 2013: enforcing bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship: World Health Organization; 2013.

23. Jiang X, Wu J, Wang J, Huang R. Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. *Tob Induc Dis*. 2019;17:29-. PubMed PMID: 31582940. eng.
24. Organization WH, Cancer IAfRo. Tobacco smoke and involuntary smoking: World Health Organization; 2004.
25. Berthiller J, Straif K, Agudo A, Ahrens W, Bezerra Dos Santos A, Boccia S, et al. Low frequency of cigarette smoking and the risk of head and neck cancer in the INHANCE consortium pooled analysis. *International journal of epidemiology*. 2016 Jun;45(3):835-45. PubMed PMID: 26228584. Pubmed Central PMCID: PMC5005938. Epub 2015/08/01. eng.
26. Goldstein BY, Chang SC, Hashibe M, La Vecchia C, Zhang ZF. Alcohol consumption and cancers of the oral cavity and pharynx from 1988 to 2009: an update. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 2010 Nov;19(6):431-65. PubMed PMID: 20679896. Pubmed Central PMCID: PMC2954597. Epub 2010/08/04. eng.
27. Boeing H. Alcohol and risk of cancer of the upper gastrointestinal tract: first analysis of the EPIC data. *IARC scientific publications*. 2002;156:151-4. PubMed PMID: 12484152. Epub 2002/12/18. eng.
28. Group IW. Alcohol drinking, 13-20 October 1987. IARC. *Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 1988;44:1-378.
29. Koch WM, McQuone S. Clinical and molecular aspects of squamous cell carcinoma of the head and neck in the nonsmoker and nondrinker. *Current opinion in oncology*. 1997 May;9(3):257-61. PubMed PMID: 9229148. Epub 1997/05/01. eng.
30. Hashibe M, Brennan P, Chuang S-C, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(2):541-50. PubMed PMID: 19190158. Epub 02/03. eng.
31. Schatzkin A, Subar AF, Thompson FE, Harlan LC, Tangrea J, Hollenbeck AR, et al. Design and serendipity in establishing a large cohort with wide dietary intake distributions : the National Institutes of Health-American Association of Retired Persons Diet and Health Study. *American journal of epidemiology*. 2001 Dec 15;154(12):1119-25. PubMed PMID: 11744517. Epub 2001/12/18. eng.
32. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000 May 3;92(9):709-20. PubMed PMID: 10793107. Epub 2000/05/04. eng.
33. El-Mofty SK. Human papillomavirus-related head and neck squamous cell carcinoma variants. *Seminars in diagnostic pathology*. 2015 Jan;32(1):23-31. PubMed PMID: 25804342. Epub 2015/03/26. eng.

34. Jackson RS, Sinha P, Zenga J, Kallogjeri D, Suko J, Martin E, et al. Transoral Resection of Human Papillomavirus (HPV)-Positive Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx: Outcomes with and Without Adjuvant Therapy. *Annals of surgical oncology*. 2017 Nov;24(12):3494-501. PubMed PMID: 28808988. Epub 2017/08/16. eng.
35. Maruyama H, Yasui T, Ishikawa-Fujiwara T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T, et al. Human papillomavirus and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma among Japanese population. *Cancer science*. 2014 Apr;105(4):409-17. PubMed PMID: 24521534. Pubmed Central PMCID: PMC4317800. Epub 2014/02/14. eng.
36. 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 Journal of Medicine*. 2007;356(19):1944-56. PubMed PMID: 17494927.
37. Herrero R, Castellsagué 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. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(23):1772-83.
38. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Hoffman HT, Wang DH, Haugen TH, et al. Human Papillomavirus in Oral Exfoliated Cells and Risk of Head and Neck Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2004;96(6):449-55.
39. Chaturvedi AK, D'Souza G, Gillison ML, Katki HA. Burden of HPV-positive oropharynx cancers among ever and never smokers in the U.S. population. *Oral oncology*. 2016 Sep;60:61-7. PubMed PMID: 27531874. Epub 2016/08/18. eng.
40. Passos EP, Ramos JGL, Martins-Costa SH, Magalhães JA, Menke CH, Freitas F. *Rotinas em ginecologia*: Artmed Editora; 2017.
41. Bernard H-U, Burk RD, Chen Z, van Doorslaer K, zur Hausen H, de Villiers E-M. Classification of papillomaviruses (PVs) based on 189 PV types and proposal of taxonomic amendments. *Virology*. 2010;401(1):70-9. PubMed PMID: 20206957. Epub 03/05. eng.
42. de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology*. 2004 2004/06/20;324(1):17-27.
43. Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology. *Gynecologic oncology*. 2007 Nov;107(2 Suppl 1):S2-5. PubMed PMID: 17938014. Epub 2007/11/22. eng.
44. Burd EM. Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical microbiology reviews*. 2003 Jan;16(1):1-17. PubMed PMID: 12525422. Pubmed Central PMCID: PMC145302. Epub 2003/01/15. eng.
45. Papillomaviruses H. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Lyon, France: IARC. 2011.
46. Satterwhite CL, Torrone E, Meites E, Dunne EF, Mahajan R, Ocfemia MC, et al. Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence

- estimates, 2008. Sexually transmitted diseases. 2013 Mar;40(3):187-93. PubMed PMID: 23403598. Epub 2013/02/14. eng.
47. Harden ME, Munger K. Human papillomavirus molecular biology. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2017 Apr-Jun;772:3-12. PubMed PMID: 28528688. Epub 07/05. eng.
48. Castle PE, Rodríguez AC, Burk RD, Herrero R, Wacholder S, Alfaro M, et al. Short term persistence of human papillomavirus and risk of cervical precancer and cancer: population based cohort study. *BMJ*. 2009;339:b2569.
49. Muñoz N, Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, et al. Impact of human papillomavirus (HPV)-6/11/16/18 vaccine on all HPV-associated genital diseases in young women. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010 Mar 3;102(5):325-39. PubMed PMID: 20139221. Epub 2010/02/09. eng.
50. de Martel C, Plummer M, Vignat J, Franceschi S. Worldwide burden of cancer attributable to HPV by site, country and HPV type. *Int J Cancer*. 2017 Aug 15;141(4):664-70. PubMed PMID: 28369882. Pubmed Central PMCID: PMC5520228. Epub 2017/04/04. eng.
51. Flores ER, Allen-Hoffmann BL, Lee D, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *Journal of virology*. 2000 Jul;74(14):6622-31. PubMed PMID: 10864676. Pubmed Central PMCID: PMC112172. Epub 2000/06/23. eng.
52. Rivoire WA, Corleta HVE, Brum IS, Capp E. Biologia molecular do câncer cervical. *Revista Brasileira de Saúde Materno Infantil*. 2006;6(4):447-51.
53. Arruda JT, Bordin BM, Miranda LCB, Maia DLM, de Oliveira Moura KKV. Proteína P53 e o Câncer: controvérsias e esperanças. *Revista EVS-Revista de Ciências Ambientais e Saúde*. 2008;35(1):123-41.
54. Gao G, Smith DI. Human Papillomavirus and the Development of Different Cancers. *Cytogenetic and genome research*. 2016;150(3-4):185-93. PubMed PMID: 28245440. Epub 2017/03/01. eng.
55. Bohra A, Bhateja S. Carcinogenesis and Sex Hormones: A Review. *Endocrinology and Metabolic Syndrome*. 2015;4:1-4.
56. Sever R, Glass CK. Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(3):a016709-a. PubMed PMID: 23457262. eng.
57. Davey RA, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev*. 2016;37(1):3-15. PubMed PMID: 27057074. eng.
58. Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *Journal of molecular biology*. 2016 Sep 25;428(19):3831-49. PubMed PMID: 27380738. Epub 2016/07/07. eng.
59. Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest*. 2006;116(3):561-70. PubMed PMID: 16511588. eng.

60. Burns KA, Korach KS. Estrogen receptors and human disease: an update. *Arch Toxicol.* 2012;86(10):1491-504. PubMed PMID: 22648069. Epub 05/31. eng.
61. Munoz J, Wheler J, Kurzrock R. Expression of estrogen and progesterone receptors across human malignancies: new therapeutic opportunities. *Cancer metastasis reviews.* 2015 Dec;34(4):547-61. PubMed PMID: 25543191. Epub 2014/12/30. eng.
62. Sherbet GV. Hormonal influences on cancer progression and prognosis. *Vitamins and hormones.* 2005;71:147-200. PubMed PMID: 16112268. Epub 2005/08/23. eng.
63. Kamińska M, Ciszewski T, Łopacka-Szatan K, Miotła P, Starosławska E. Breast cancer risk factors. *Prz Menopauzalny.* 2015;14(3):196-202. PubMed PMID: 26528110. Epub 09/30. eng.
64. Michaud JE, Billups KL, Partin AW. Testosterone and prostate cancer: an evidence-based review of pathogenesis and oncologic risk. *Ther Adv Urol.* 2015;7(6):378-87. PubMed PMID: 26622322. eng.
65. Hashim D, Sartori S, Vecchia CL, Serraino D, Maso LD, Negri E, et al. Hormone factors play a favorable role in female head and neck cancer risk. *Cancer Medicine.* 2017;6(8):1998-2007.
66. Goulioumis A, Fuxe J, Varakis J, Repanti M, Goumas P, Papadaki HoE. Estrogen receptor-beta expression in human laryngeal carcinoma: correlation with the expression of epithelial-mesenchymal transition specific biomarkers. *Oncology reports.* 2009 11/01;22:1063-8.
67. Tavassoli M, Soltaninia J, Rudnicka J, Mashanyare D, Johnson N, Gäken J. Tamoxifen inhibits the growth of head and neck cancer cells and sensitizes these cells to cisplatin induced-apoptosis: role of TGF-beta1. *Carcinogenesis.* 2002 Oct;23(10):1569-75. PubMed PMID: 12376463. Epub 2002/10/12. eng.
68. Kwon S, Ahn S-H, Jeong W-J, Jung YH, Bae YJ, Paik JH, et al. Estrogen receptor α as a predictive biomarker for survival in human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of Translational Medicine.* 2020 2020/06/16;18(1):240.
69. Liu X, Qing S, Che K, Li L, Liao X. Androgen receptor promotes oral squamous cell carcinoma cell migration by increasing EGFR phosphorylation. *Onco Targets Ther.* 2019;12:4245-52. PubMed PMID: 31239703. Pubmed Central PMCID: PMC6557262. Epub 2019/06/27. eng.
70. Tomasovic-Loncaric C, Fucic A, Andabak A, Andabak M, Ceppi M, Bruzzzone M, et al. Androgen Receptor as a Biomarker of Oral Squamous Cell Carcinoma Progression Risk. *Anticancer research.* 2019 Aug;39(8):4285-9. PubMed PMID: 31366519. Epub 2019/08/02. eng.
71. Rosenthal N, Brown S. The mouse ascending: perspectives for human-disease models. *Nature cell biology.* 2007 Sep;9(9):993-9. PubMed PMID: 17762889. Epub 2007/09/01. eng.

72. Justice MJ, Dhillon P. Using the mouse to model human disease: increasing validity and reproducibility. *Disease Models & Mechanisms*. 2016;9(2):101.
73. Arbeit JM, Münger K, Howley PM, Hanahan D. Progressive squamous epithelial neoplasia in K14-human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Journal of virology*. 1994 Jul;68(7):4358-68. PubMed PMID: 7515971. Pubmed Central PMCID: PMC236359. Epub 1994/07/01. eng.
74. Santos C, Vilanova M, Medeiros R, Gil da Costa RM. HPV-transgenic mouse models: Tools for studying the cancer-associated immune response. *Virus research*. 2017 May 2;235:49-57. PubMed PMID: 28385491. Epub 2017/04/08. eng.
75. Mestre VF, Medeiros-Fonseca B, Estêvão D, Casaca F, Silva S, Félix A, et al. HPV16 is sufficient to induce squamous cell carcinoma specifically in the tongue base in transgenic mice. *The Journal of Pathology*. 2020;251(1):4-11.

ANEXO

Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa Animal

Comissão de Ética da UTAD

Parecer da Comissão de Ética Nº.	10/2013
Data:	08-07-2013
Assunto:	Doc8/CE/2013 Projeto de investigação "Mecanismos de carcinogénese e estratégias preventivas/terapêuticas em murganhos K14-HPV16".
Requerente:	Paula Alexandra Martins De Oliveira

O projeto "Mecanismos de carcinogénese e estratégias preventivas/terapêuticas em murganhos K14-HPV16" apresenta contributos para perceber a interação dos papilomavírus na carcinogénese, estratégias profiláticas e métodos de monitorização não-invasivos. Este projeto tem em conta os requisitos regulamentares para salvaguarda do bem-estar animal e são definidos os números de animais a utilizar. A análise ética e de custo benefício apontam para a importância do projeto estando salvaguardados os princípios dos 3Rs.

Embora referido que vão ser assegurados a introdução de "Human Endpoints" e formas de facilitar o seu diagnóstico mais precoce, a CE sugere a introdução de registos de escalas clínicas para melhor implementação dos mesmos.

Assim, a CE é de parecer positivo à realização deste projeto na sua componente de investigação animal.

Pela Comissão de Ética
A Presidente da Comissão,


Maria da Conceição Azevedo