

**Universidade de São Paulo
Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**



LUCIANA REIS ROSA SACOMAN

**AVALIAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DO HPV16 E SEU SÍTIO DE
INTEGRAÇÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS NORMAIS E NEOPLÁSICAS DA
CÉRVIX E TONSILAS**

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical
de São Paulo da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo

2018

LUCIANA REIS ROSA SACOMAN

**AVALIAÇÃO DO PERFIL GENÉTICO DO HPV16 E SEU SÍTIO DE
INTEGRAÇÃO EM CÉLULAS EPITELIAIS NORMAIS E NEOPLÁSICAS DA
CÉRVIX E TONSILAS**

Tese apresentada ao Instituto de Medicina Tropical
de São Paulo da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde
Internacional

Orientador: Dr. José Eduardo Levi

São Paulo

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo – Bibliotecário Carlos José Quinteiro, CRB-8 5538

© Reprodução autorizada pelo autor

Rosa-Sacoman, Luciana Reis

Avaliação do perfil genético do HPV16 e seu sítio de integração em células epiteliais normais e neoplásicas da cérvix e tonsilas / Luciana Reis Rosa-Sacoman. – São Paulo, 2018.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientador: José Eduardo Levi

Descritores: 1. HPV. 2. PREVALÊNCIA. 3. NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO. 4. NEOPLASIAS DO COLO UTERINO. 5. BIOLOGIA MOLECULAR. 6. SEQUENCIAMENTO GENÉTICO.

USP/IMTSP/BIB-13/2018.

SUA MELHOR CONTRIBUIÇÃO PARA A HUMANIDADE TALVEZ NÃO SEJA ALGO QUE
VOCÊ FAÇA, MAS ALGUÉM QUE VOCÊ CRIE.

- AUTOR DESCONHECIDO -

RESUMO

RESUMO

Rosa-Sacoman LR. Avaliação do perfil genético do HPV16 e seu sítio de integração em células epiteliais normais e neoplásicas da cérvix e tonsilas (tese). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

O papilomavírus humano (HPV) atua como importante agente etiológico em um subgrupo de tumores humanos, sendo responsável pelo desenvolvimento de quase 100% dos tumores cervicais e uma porcentagem variável dos carcinomas de cabeça e pescoço, principalmente da orofaringe. Dentre os HPVs de alto risco, o HPV16 é o tipo mais prevalente nos tumores de orofaringe, encontrado em mais de 80% dos tumores HPV positivos, e 50% dos casos de carcinoma cervical. Em lesões de baixo grau, o genoma do HPV geralmente permanece na forma epissomal, em contraste, na maioria das lesões cancerígenas, o DNA dos HPVs de alto risco é frequentemente quebrado e integrado ao genoma da célula hospedeira. Há um enorme esforço da comunidade científica na identificação de regiões susceptíveis à integração viral, permitindo uma maior compreensão do processo de transformação causado por HPV. Este estudo teve como objetivo identificar, a partir do sequenciamento do genoma completo do HPV16, padrões moleculares capazes de responder pelo tropismo diferencial apresentado pelo HPV16 e do curso assintomático ou transformante da infecção pelo HPV16 na região da orofaringe. Amostras FFPE de CECP estavam disponíveis em 510 pacientes que foram recrutados em três hospitais brasileiros e 113 pacientes sem neoplasia tiveram amostras a fresco de tonsila não neoplásica analisadas. A detecção e genotipagem do HPV foi realizada pelo método *Inno-Lipa*, enquanto a reação de PCR com os iniciadores *PGMY09/11* foi empregada para tecidos não neoplásicos. Todas as amostras positivas para HPV tiveram a presença de HPV16 investigada por PCR em tempo real. As amostras com presença

exclusiva de HPV16 foram submetidas ao sequenciamento pela metodologia de NGS – na plataforma *Ion Torrent PGM* utilizando a tecnologia de *Target Seq* e a análise dos produtos sequenciados foram realizadas em colaboração com o laboratório da Dr Lisa Mirabello, no NIH. A frequência de DNA de HPV de alto risco em CEC de cabeça e pescoço foi de 10% (49/491), sendo 78% deles HPV16. Houve grande variabilidade na prevalência do HPV nos tumores segundo o sítio anatômico, variando de 3,4% (base da língua e hipofaringe) a 25% (orofaringe). Em contraste, não houve presença de hrHPV-DNA nas amígdalas não neoplásicas analisadas. A análise do sequenciamento do HPV16 foi viável em quatro amostras, que apresentaram 99-100% de identidade com o HPV16. Uma delas apresentou uma deleção de 300nt na região L2 possivelmente atribuída ao processo de integração. No presente estudo, a crescente frequência de DNA de HPV em CEC (principalmente na orofaringe) corrobora a hipótese de que o HPV está iniciando sua projeção nesse continente, apesar de ainda não estar circulante entre o tecido normal de tonsila da população brasileira. Estudos envolvendo a avaliação da expressão proteica associada à infecção por HPV devem ser conduzidos para reforçar se esse perfil crescente de DNA de HPV também reflete uma crescente participação etiológica do HPV 16 nos novos casos de tumores epidermóides de orofaringe no Brasil.

Descritores: HPV. Prevalência. Neoplasias de cabeça e pescoço. Neoplasia do colo uterino. Biologia molecular. Sequenciamento genético.

ABSTRACT

ABSTRACT

Rosa-Sacoman, LR. Evaluation of the genetic profile of HPV16 and its integration site in normal and neoplastic epithelial cells from cervix and tonsils (thesis). São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2018.

Human papillomavirus (HPV) acts as an important etiologic agent in a subset of human tumors, responsible for the development of almost 100% of cervical tumors and a variable percentage of head and neck carcinomas, mainly of the oropharynx. Among high-risk HPV, HPV16 is the most prevalent type in oropharyngeal tumors, found in more than 80% of HPV positive tumors, and 50% of cases of cervical carcinoma. In low grade lesions, the HPV genome generally remains episomal; in contrast, in most cancerous lesions, the DNA of high-risk HPVs is often disrupted and integrated into the host cell genome. There is a huge effort by the scientific community to identify regions susceptible to viral integration, allowing a greater understanding of the transformation process caused by HPV. The aim of this study was to identify, from the complete genome sequencing of HPV16, molecular patterns capable of responding to the differential tropism presented by HPV16 and to the asymptomatic or transforming course of HPV16 infection in the oropharynx region. FFPE samples of HNSCC were available from 510 patients who were recruited at three Brazilian hospitals and 113 patients with no neoplasia had fresh samples of non-neoplastic tonsil analyzed. HPV detection and genotyping was performed using the *Inno-Lipa* method, while the PCR reaction with *PGMY09/11* primers was used for non-neoplastic tissues. All HPV positive samples had the presence of HPV16 investigated by real-time PCR. Samples with exclusive HPV16 presence were submitted to sequencing by the NGS methodology - on the *Ion Torrent PGM* platform using *Target Seq* technology and the analysis of the sequenced products were performed in

collaboration with Dr. Lisa Mirabello's laboratory at NIH. The frequency of high-risk HPV DNA in HNCSS was 10% (49/491), 78% of which were HPV16. There was a huge variability in the prevalence of HPV in the tumors according to the anatomical site, ranging from 3.4% (base of the tongue and hypopharynx) to 25% (oropharynx). In contrast, no hrHPV-DNA was present in the non-neoplastic tonsils analyzed. HPV16 sequencing analysis was feasible in four samples, which showed 99-100% identity with HPV16. One of them presented a 300nt deletion in the L2 region possibly attributed to the integration process. In the present study, the increasing frequency of HPV DNA in HNSCC (mainly in the oropharynx) corroborates the hypothesis that HPV is initiating its projection in this continent, although it is not yet circulating among the normal tonsil tissue of the Brazilian population. Studies involving the evaluation of protein expression associated with HPV infection should be conducted to reinforce whether this increasing profile of HPV DNA also reflects an increasing etiological involvement of HPV 16 in the new cases of oropharyngeal squamous cell carcinomas in Brazil.

Descriptors: HPV. Prevalence. Head and neck neoplasia. Cervical neoplasia. Molecular biology. Genetic sequencing.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

6.1 Prevalência de HPV em tumores de Cabeça e Pescoço

A prevalência de HPV em pacientes com CECP de tecido emblocado em parafina correspondeu a 10% (49 HPV+ / 491 amostras). Apesar de ser uma prevalência baixa quando comparada a outras localizações, como EUA e Europa, que chegam a ultrapassar 60%, para o Brasil é uma das maiores taxas já reportadas²⁵, apesar de apresentar dados concordantes na prevalência de HPV16, que corresponde a 78% das amostras positivas.

Devido à diversidade de sítios anatômicos de carcinomas de cabeça e pescoço incluídos nessa casuística, essa prevalência pode ser ainda maior se isolados por sítio anatômico específico, como é o caso da orofaringe, na qual a prevalência atinge 25% dos casos desse sítio anatômico nas amostras do Hospital das Clínicas de SP, sendo todos os casos positivos para HPV 16, confirmando sua alta prevalência dentre os tumores dessa região associados ao papilomavírus humano.

Observou-se um aumento significativo da prevalência do DNA-HPV em tumores de orofaringe quando comparado a série anterior, com HPV16 desempenhando o principal papel da carcinogênese desses tumores (Tabela 3).

A divergência nas taxas de DNA do HPV observada pode ser atribuída não só as diferenças nas metodologias utilizadas para a detecção do HPV nos diferentes estudos, mas também às características dos indivíduos em estudo, incluindo práticas sexuais, status econômico e social. Infelizmente, a ausência de informações sócio demográficas e de comportamento sexual dos pacientes avaliados impede uma análise adicional.

Em conclusão, a crescente frequência de DNA de HPV em CECP (principalmente na orofaringe) corrobora a hipótese de que o HPV está iniciando sua projeção nesse continente, apesar de não estar circulante entre o tecido normal de

tonsila da população brasileira. Estudos envolvendo a avaliação da expressão proteica associada à infecção por HPV devem ser conduzidos para reforçar se esse perfil crescente de DNA de HPV também reflete uma crescente participação etiológica do HPV 16 nos novos casos de tumores epidermóides de orofaringe no Brasil.

6.2 Análise Mutacional em tumores de Cabeça e Pescoço

A análise piloto de 98 casos de tumores de cabeça e pescoço do Gencapo em colaboração com o IARC levou ao sequenciamento de genes específicos associados ao desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço. O status HPV desta amostra foi baseado em sorologia anti-HPV16-E6. Essa casuística apresentou 8% de positividade para o HPV, no entanto, 75% dos casos apresentaram mutação em pelo menos um gene dos cinco genes analisados. Esta evidência aumenta a discussão do papel do HPV como um indutor de carcinogênese ou simplesmente um agente passivo no processo natural de carcinogênese dos tumores de cabeça e pescoço.

Foram identificados casos de CEC com poucas alterações que se diferenciam como um subconjunto de tumores de cabeça e pescoço dirigidos predominantemente por mutações gênicas e alterações focais em vez de eventos de instabilidade cromossômica, sendo caracterizados por uma maior sobrevida geral. Avaliações mais específicas são necessárias para estabelecer esta associação entre as alterações “drivers” e “passengers” nas amostras HPV positivas, assim como as informações relatadas no artigo apresentado no Apêndice B, que mostrou uma clara associação com ambas as exposições ambientais (consumo de álcool e fumo e infecção pelo HPV) e às características clínicas. Mais estudos integrando dados genômicos, clínicos e epidemiológicos, especialmente em populações de alto risco, são necessários para melhor identificar a estratificação de alto risco e caracterizar o prognóstico de casos de câncer de cabeça e pescoço.

6.3 Sequenciamento de nova geração (NGS) HPV16

O sequenciamento do HPV16 em amostras de CCP, principalmente aqueles da orofaringe, apresentou um desafio importante no desenvolvimento dessa tese. Esse foi o objetivo inicial e principal apresentado, com o intuito de correlacionar o sequenciamento dessas amostras com o sítio de integração ao DNA humano, em regiões conhecidas de instabilidade cromossômica, e comparar com o HPV16 que igualmente infecta a região da cérvix uterina.

O protocolo desenvolvido foi inteiramente customizado, elaborado em conjunto com o suporte técnico da empresa, porém, devido a questões técnicas, muitos foram os contratempos encontrados nessa elaboração. Infelizmente, por esse motivo, não tivemos sucesso na detecção das regiões de DNA humano flanqueadoras, além do baixo rendimento obtido com as amostras sequenciadas, assim como a ausência de amostras representativas da cérvix uterina para realizar a comparação entre o vírus nos diferentes sítios anatômicos, como proposto inicialmente.

Apesar disso, a análise em colaboração com o NIH apresentou dados interessantes que precisam ser confirmados posteriormente, principalmente nas regiões de deleção.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Strauss Mj, Shaw Ew. Crystalline virus-like particles from skin papillomas characterized by intranuclear inclusion bodies. *Proc Soc Exp Biology and Medicine*. 1949;72:46-50.
2. Pannone G; Santoro A; Papagerakis S; et al. The role of Human Papillomavirus in the pathogenesis of Head & Neck Squamous Cell Carcinoma: an overview; *Infectious Agents and Cancer* 2011, 6:4 doi:10.1186/1750-9378-6-4
3. de Sanjose S, Brotons M, Pavon MA. The natural history of human papillomavirus infection. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2018;47:2-13.
4. Marklund L, Hammarstedt L. Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol*. 2011;2011:509036.
5. de Villiers, E.M., 2013. Cross-roads in the classification of papillomaviruses. *Virology* 445, 2–10.
6. Muñoz N, Bosch Fx, De Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. *N Engl J Med* 2003;348:518-27.
7. Shukla S, Bharti Ac, Mahata S, et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. *Indian J Med Res*. 2009;130(3):222-33.
8. Dunne Ef, Nielson Cm, Stone KM. Prevalence of HPV infection among men: A systematic review of the literature. *J Infect Dis*. 2006;194:1044-57.
9. Schabath Mb, Villa LI, Lazcano-Ponce E. Smoking and Human Papillomavirus (HPV) Infection in the HPV in Men (HIM) Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21:102-110.
10. Andl T, Kahn T, Pfuhl A, et al. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer Research*. 1998;58:5-13.
11. Frisch M, Biggar Rj. A etiological parallel between tonsillar and anogenital squamous-cell carcinomas. *Lancet*. 1999;354:1442-3.
12. Weinberg Pm, Yu Z, Haffty Bg, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*. 2006;24:736-47.
13. D'Souza G, Kreimer Ar, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007;356:1944-56.
14. Jung Ac, Briolat J, Millon R, et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2010;126:1882-94.
15. Li Lw, Li Yy, Li Xy, et al. A novel tumor suppressor gene ECRG4 interacts directly with Tmprss11a (ECRG1) to inhibit cancer cell growth in esophageal carcinoma. *BMC Cancer*. 2011;11:52-9.
16. Kreimer Ar, Clifford Gm, Boyle P, et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:467-75.

17. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, et al. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol.* 2010;29:2-15.
18. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009;199:1263-1269.
19. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2011;61:69-90.
20. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature.* 2015;517:576-82.
21. Taberna M, Mena M, Pavón MA, et al. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Annals of Oncology.* 2017;28:2386–2398.
22. Duvvuri U, Myers JN. Contemporary management of oropharyngeal cancer: anatomy and physiology of the oropharynx. *Curr Probl Surg.* 2009;46:119-84.
23. Westra WH, Taube JM, Poeta ML et al. Inverse Relationship between Human Papillomavirus-16 Infection and Disruptive p53 Gene Mutations in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res.* 2008;14:366-9.
24. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26:3128-37.
25. O'Regan EM, Toner ME, Finn SP, et al. p16(INK4A) genetic and epigenetic profiles differ in relation to age and site in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Pathol.* 2008;39:452-8.
26. López RVM, Levi JE, Eluf-Neto J, et al. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. *Cancer Causes Control.* 2014; 25:461-71.
27. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11:9-22.
28. Havre PA, Yuan J, Hedrick L, et al. p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer Research.* 1995;55:4420-4.
29. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clinical Cancer Research.* 2009;15:6758-62.
30. Peter M, Stransky N, Couturier J, et al. Frequent genomic structural alterations at HPV insertion sites in cervical carcinoma. *J Pathol.* 2010;221:320-30.
31. Parfenov M, Pedamallu CS, Gehlenborg N, Freeman SS, Danilova L, Bristow CA, et al. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111(43):15544–9.
32. McBride AA, Warburton A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. *PLoS Pathog.* 2017;13(4):e1006211.
33. Vojtechova Z, Sabol I, Salakova M, Turek L, Grega M, Smahelova J, et al. Analysis of the integration of human papillomaviruses in head and neck tumours in relation to patients' prognosis. *Int J Cancer.* 2016; 138(2):386–95.
34. Gao G, Johnson SH, Vasmatzis G, Pauley CE, Tombers NM, Kasperbauer JL, et al. Common fragile sites (CFS) and extremely large CFS genes are targets for

human papillomavirus integrations and chromosome rearrangements in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer*. 2017;56(1):59-74.

35. Conway C, Chalkley R, High A, et al. Next-generation sequencing for simultaneous determination of human papillomavirus load, subtype, and associated genomic copy number changes in tumors. *J Mol Diagn*. 2012;14:104-11.

36. Tuna M and Amos CI. Next generation sequencing and its applications in HPV associated cancers. 2016

37. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;0:1-31.

38. Papanicolaou GN, Traut HF. The diagnostic value of vaginal smears in carcinoma of the uterus. *Am J Obstet Gynecol*. 1941;42:193-206.

39. Belinson SE, Belinson JL. Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening: practical aspects in developing countries. *Mol Diagn Ther*. 2010;14:215-22.

40. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005;55(2):74-108.

41. Castellsagué X, Muñoz N. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis - role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;31:20-8.

42. Schabath MB, Villa LL, Lazcano-Ponce E. Smoking and Human Papillomavirus (HPV) Infection in the HPV in Men (HIM) Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2012;21:102-110.

43. Sankaranarayanan R, Nene BM, Shastri SS, et al. HPV screening for cervical cancer in rural India. *N Eng J Med*. 2009;360:1385-94.

44. Martins TR, Oliveira, CM, Rosa LR, et al. HPV genotype distribution in Brazilian women with and without cervical lesions: correlation to cytological data. *Virology Journal*. 2016 Aug 12;13(1):138.

45. Cuzick J, Clavel C, Petry KU, et al. Overview of the European and North American studies on HPV testing in primary cervical cancer screening. *Int J Cancer*. 2006;119:1095-101.

46. Martins TR, Longatto-Filho A, Cohen D, et al. Influence of prior knowledge of human papillomavirus status on the performance of cytology screening. *Am J Clin Pathol*. 2018;7:149(4):316-323.

47. INCA, Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro: INCA,2017.[<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>]

48. Ha PK, Califano JA: The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:188-96.

49. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.

50. Ng M, Freeman MK, Fleming TD et al. Smoking prevalence and cigarette consumption in 187 countries, 1980–2012. *JAMA* 2014; 311(2):183–192.

51. Gillison ML, Chaturvedi AK, Anderson WF, Fakhry C. Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2015; 33(29): 3235–3242.
52. Smith, RB, Sniezek JC, Weed DT et al. Utilization of free tissue transfer in head and neck surgery. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2007;137;182–191.
53. Vergeer MR, Doornaert PA, Rietveld DH, et al. Intensity-modulated radiotherapy reduces radiation-induced morbidity and improves health-related quality of life: results of a nonrandomized prospective study using a standardized follow-up program. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2009;74:1–8.
54. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011;11(1):9-22.
55. D'Souza G, Anantharaman D, Gheit T, et al. Effect of HPV on head and neck cancer patient survival, by region and tumor site: A comparison of 1362 cases across three continents. *Oral Oncol.* 2016; 62: 20–27.
56. Torre LA, Bray F, Siegel RL. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65:87–108.
57. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol.* 2013; 31:4550–4559.
58. Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, et al. Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol.* 2011; 40:489–502.
59. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, et al. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol.* 2009;27:1992–8.
60. Ang KK, Harris J, Wheeler R et al. “Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer,” *New England Journal of Medicine*, vol. 363, no. 1, pp. 24–35, 2010
61. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer.* 2000;89(3):300-4.
62. Gillison ML, Lowy DR. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet.* 2004;363(9420):1488-9.
63. Weinberg PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol.* 2006;24:736-47.
64. Lindquist D, Romanitan M, Hammarstedt L, et al. Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Mol Oncol.* 2007;1(3):350-5.
65. Fakhry C, Westra WH, LI S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:261-9.
66. Licitra L, Perrone F, Bossi P, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006;24:5630–6.

67. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2000;92:709-20.
68. Vu HL, Sikora AG, Fu S, Kao J. HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy. *Cancer Lett* 2010; 288(2):149–155.
69. Spanos WC, Nowicki P, Lee DW et al. “Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer,” *Archives of Otolaryngology—Head and Neck Surgery*, vol. 135, no. 11, pp. 1137–1146, 2009.
70. Oliveira CMd, Bravo IG., Souza NCSe, et al. High-level of viral genomic diversity in cervical cancers: A Brazilian study on human papillomavirus type 16. *Infection, Genetics and Evolution.* 34:2015;44–51.
71. Turner Do, Williams-Cocks Sj, Bullen R, et al. High-risk human papillomavirus (HPV) screening and detection in healthy patient saliva samples: a pilot study. *BMC Oral Health.* 2011;11:28.
72. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA e Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 1985;230:1350-1354.
73. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999;189:12-9.
74. Scapulatempo-Neto C, Veo C, Fregnani JHTG, Lorenzi A, Mafra A, Melani AGF, et al. Characterization of topoisomerase II alpha and minichromosome maintenance protein 2 expression in anal carcinoma. *Oncol Lett.* 2017;13(3):1891-1898.
75. Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol.* 1996;266:383-402.
76. Katoh, Rozewicki, Yamada. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. 2017. [Briefings in Bioinformatics, in press.](#)
77. Posada D, Crandall KA. MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 1998;14:817-8.
78. Pond SL, Frost SD, Muse SV. HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics.* 2005;21:676-9.
79. Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, Nei M. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Software. *Bioinformatics.* 2004;17:1244-45.
80. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 2009; 25: 1451-2.
81. Perdomo S, Anantharaman D, Foll M, Abedi-Ardekani B, Durand G, Reis Rosa LA, et al. Genomic analysis of head and neck cancer cases from two high incidence regions. *PLoS ONE.* 2018;13(1):e0191701.
82. Barros-Filho MC, Reis-Rosa LA, Hatakeyama M, et al. Oncogenic drivers in 11q13 associated with prognosis and response to therapy in advanced oropharyngeal carcinomas. *Oral Oncology.* 2018;83:81–90
83. Mirabello L, Yeager M, Yu K, et al. HPV16 E7 Genetic Conservation Is Critical to Carcinogenesis. *Cell.* 2017; 170(6): 1164–1174.