

# Universidad de Oviedo



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

**Programa de doctorado: Investigación en cáncer**

## **Infección por el Virus del Papiloma Humano (HPV) en Carcinomas Epidermoides de Laringe, Hipofaringe y Orofaringe**

**TESIS DOCTORAL**

**Fabián García Velasco**

Directores: Dr. D. Juan Pablo Rodrigo Tapia  
Dr. D. Mario Hermsen



**Universidad de Oviedo**



Universidad de Oviedo  
*Universidá d'Uviéu*  
*University of Oviedo*

**Programa de doctorado: Investigación en cáncer**

**Infección por el Virus del Papiloma  
Humano (HPV) en Carcinomas  
Epidermoides de Laringe, Hipofaringe  
y Orofaringe**

**TESIS DOCTORAL**

**Fabián García Velasco**

**Directores:** Dr. D. Juan Pablo Rodrigo Tapia  
Dr. D. Mario Hermsen

**Tutor:** Dr. D. Juan Pablo Rodrigo Tapia







### 1.- Título de la Tesis

Español/Otro Idioma: Infección por el Virus del Papiloma Humano (HPV) en carcinomas epidermoides de laringe, hipofaringe y orofaringe.	Inglés: Human papillomavirus infection in laryngeal, hypopharyngeal and oropharyngeal squamous cell carcinomas
--	--

### 2.- Autor

**Nombre:** FABIAN GARCIA VELASCO

**DNI/Pasaporte/NIE:**

**Programa de Doctorado:** Investigación en Cáncer

**Órgano responsable:** INSTITUTO UNIVERSITARIO DE ONCOLOGÍA

**Introducción:** Estudios recientes apoyan un papel importante del virus del papiloma humano (HPV) en carcinomas epidermoides de orofaringe (OPSCC), aunque la incidencia varía ampliamente dependiendo de la ubicación geográfica y el período de tiempo estudiado. La implicación del HPV en los tumores de cabeza y cuello no orofaríngeos es incierta.

**Objetivo:** El objetivo de esta tesis fue determinar la prevalencia de infección por HPV en carcinomas epidermoides de orofarínge, laringe (LSCC) e hipofaringe (HPSCC) en el norte de España, y estudiar las características clínicas e histopatológicas de los tumores asociados y no asociados al HPV a fin de observar las diferencias existentes entre ellos.

**Material y métodos:** se recopilaron datos clínicos y se estudiaron muestras histológicas embebidas en parafina, de 248 pacientes consecutivos tratados quirúrgicamente para OPSCC (140 de amígdala y 108 de base de lengua) entre 1990 y 2009, y de 124 pacientes consecutivos tratados quirúrgicamente de carcinomas epidermoides de laringe (62 casos) e hipofaringe entre 2002 y 2007. Las muestras fueron histomorfológicamente evaluadas, y la expresión proteica de p16 y p53 se analizó mediante estudio inmunohistoquímico. La detección del ADN del HPV de alto riesgo se realizó mediante GP5+/6+-PCR e hibridación in situ (ISH). En los casos positivos para el HPV, se realizó una RT-PCR del ARNm de E6. **Resultados:** en OPSCC treinta casos (12%) fueron positivos para la inmunotinción de p16, de los cuales ocho (3,2% de la serie total) fueron positivos para HPV tipo 16 por



genotipado de los productos GP5+/6+- PCR. Todos los tumores HPV GP5+/6+ -PCR positivos fueron p53-negativos, siete tenían una morfología basaloide y siete también fueron positivos para HPV por ISH. La presencia de HPV se correlacionó inversamente con el consumo de tabaco y alcohol ( $p < 0,001$ ), pero no con la edad al diagnóstico de OPSCC. La supervivencia global fue mejor en el grupo HPV positivo, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p = 0,175$ ).

En LSCC y HPSCC diecisiete casos (14%) fueron positivos para la inmunotinción de p16, de los cuales 2 (1 en laringe y 1 en hipofaringe, 1,6% de la serie total) resultaron positivos para el ADN del HPV por GP5+/6+-PCR posterior. Ambos casos contenían HPV tipo 16 y mostraron expresión de ARNm de E6 de HPV16.

La tinción positiva de p16 mostró una sensibilidad del 100% para detectar tumores HPV-positivos, pero no demostró una adecuada especificidad, ni valor predictivo positivo en nuestro medio. Dicha determinación tampoco mostró un valor pronóstico en ninguna localización estudiada. La ausencia de expresión de p53 estuvo presente en el 100% de los casos de OPSCC HPV-positivos. Se asoció de forma estadísticamente significativa con la ausencia de recidiva tumoral en todas las localizaciones estudiadas, y con una mejor supervivencia de forma significativa en LSCC y HPSCC.

Conclusión: el HPV muestra una baja implicación en la carcinogénesis de los carcinomas epidermoides de orofaringe en el Norte de España pero con tendencia creciente, estando presente en un 1,8% en la década 1990-1999 aumentando hasta un 6,1% de los casos en la década 2000-2009. El HPV solo está involucrado ocasionalmente en la carcinogénesis de los carcinomas epidermoides de laringe e hipofaringe en el Norte de España.



## RESUMEN (en Inglés)

**Introduction:** Recent studies support an important role for human papillomavirus (HPV) in oropharyngeal squamous cell carcinomas (OPSCC), although the incidence varies widely depending on the geographic location and time period studied. The significance of HPV in non-oropharyngeal head and neck cancers is uncertain.

**Objective:** The aim of this Doctoral Thesis was to determine the proportion of HPV in oropharyngeal, laryngeal (LSCC) and hypopharyngeal (HPSCC) squamous cell carcinoma in northern Spain, and to study the clinical and histopathological characteristics of the HPV-positive and HPV-negative tumors in order to observe the differences between them.

**Material and Methods:** Clinical records and paraffin embedded tumor specimens of 248 consecutive patients surgically treated for OPSCC (140 tonsillar and 108 base of tongue) between 1990 and 2009, and 124 consecutive patients surgically treated for laryngeal (62 cases) and hypopharyngeal (62 cases) SCCs between 2002 and 2007 were retrieved. OPSCC, LSCC and HPSCC cases were histomorphologically evaluated, and protein expression of p16 and p53 was analyzed by immunohistochemistry. Detection of high-risk HPV DNA was performed by GP5+/6+-PCR and in situ hybridization (ISH). In HPV-positive cases, RT-PCR of mRNA E6 was analyzed.

**Results:** in OPSCC thirty cases (12%) were positive for p16 immunostaining, of which eight (3.2% of the total series) were found positive for HPV type 16 by genotyping of GP5+6+-PCR products. All HPV GP5+/6+-PCR-positive tumors were p53-immunonegative, seven had a basaloid morphology and seven were also positive by HPV ISH. Presence of HPV correlated inversely with tobacco and alcohol consumption ( $p < 0.001$ ), but not with age of onset of



OPSCC. Overall survival was better in the HPV-positive group, although not statistically significant ( $p = 0.175$ ). In LSCC and HPSCC seventeen cases (14%) were positive for p16 immunostaining, of which 2 (1 larynx, 1 hypopharynx, 1.6% of total series) were found positive for HPV DNA by subsequent GP5+/6+-PCR. Both SCCs contained HPV type 16 and showed HPV16 E6 mRNA expression.

Positive staining of p16 showed a sensitivity of 100% to detect HPV-positive tumors, but did not demonstrate an adequate specificity or positive predictive value in our environment. P16 also did not show a prognostic value in any studied location. The absence of p53 expression was present in 100% of OPSCC HPV-positive cases. It was associated in a statistically significant way with the absence of tumor recurrence in all the studied locations, and with a better survival in LSCC and HPSCC.

Conclusion: OPSCC patients in northern Spain demonstrated a low involvement of HPV, increasing from 1.8% in 1990-1999 to 6.1% of cases in 2000-2009. HPV is only occasionally involved in laryngeal and hypopharyngeal SCC patients in northern Spain. P16 does not show adequate specificity or VPP for the detection of HPV-positive tumors in our environment.





## Agradecimientos

*En primer lugar al Doctor Juan Pablo Rodrigo, director de esta tesis, y tutor durante la elaboración de este y otros trabajos científicos y durante los años de mi residencia en el Hospital Universitario Central de Asturias. Por su generosidad al compartir sus conocimientos y por educarme en el rigor tanto en el plano clínico como en el científico. Por ser un ejemplo de compromiso con la profesión en todas sus vertientes, un magnífico docente y una gran persona. Ha sido un gran privilegio para mí poder colaborar con él estos años.*

*Al Doctor Suárez, jefe de Servicio de Otorrinolaringología en el HUCA durante buena parte de mis años como residente, por su ejemplo de ilusión, tesón y entusiasmo por esta bella disciplina médica que es la Otorrinolaringología, y por la mentalidad científica que nos ha sabido transmitir a todos los médicos formados bajo su dirección.*

*Al Doctor Llorente, actual jefe de Servicio del HUCA, y también tutor durante mi residencia, por haberme mostrado que se puede llegar a los límites de la especialidad con buen hacer, trabajo incansable y humildad, y por ser un magnífico espejo en el que cualquier otorrino joven puede mirarse.*

*Al Dr. Hermsen, codirector de esta tesis, la Dra. García Pedrero y el resto de integrantes del laboratorio de cabeza y cuello del IUOPA por su inestimable contribución a este trabajo.*

*A mis padres, por su dedicación plena, su amor y su apoyo incondicional, y por haberme enseñado que el trabajo, la honestidad y la humildad es el único camino para llegar a cualquier puerto, ya esté más cerca o más lejos.*

*A mi hermana Rebeca, por ser mi mejor amiga, por quererme tanto y tan bien, y por ser mi fan número uno a la vez que mi mejor crítica.*

*Y a Gloria, por su paciencia y aliento en la elaboración del manuscrito, por no dejarme desfallecer, por ser mi compañera de fatigas y desvelos y por estar siempre conmigo, aún desde la más estrecha de las distancias.*



*A mi abuelo Fabi, siempre en mi recuerdo.*



# ÍNDICE

1. Introducción	9
I. Epidemiología de los tumores de laringe, hipofaringe y orofaringe	11
a. Epidemiología del cáncer de laringe	11
b. Epidemiología del cáncer de hipofaringe	13
c. Epidemiología del cáncer de orofaringe	14
II. Etiología y factores de riesgo clásicos	15
III. Un vuelco epidemiológico	17
IV. El virus del papiloma Humano: papel en los CECC	18
V. Ciclo biológico del HPV	23
VI. Diferencias entre HPV de alto y bajo riesgo	29
VII. Implicaciones clínicas de los tumores asociados al HPV	34
VIII. Métodos de detección del HPV	37
2. Hipótesis y Objetivos	45
3. Material y Métodos	51
I. Pacientes	53
II. Construcción de matrices tisulares	57
III. Inmunotinción de p53 y p16	57
IV. Extracción de ADN tumoral	58
V. Detección del ADN del HPV y genotipado por GP5+/6+-PCR-EIA y ensayo Luminex	59
VI. Detección del ARNm del gen E6 del HPV-16	60
VII. Detección del ADN del HPV mediante hibridación “in situ”	60
VIII. Análisis estadístico	61
4. Resultados	63
a) Carcinomas de la orofaringe	65
b) Carcinomas de laringe e hipofaringe	74
5. Discusión	81
I. Infección por HPV en carcinomas epidermoides de la orofaringe	85
II. Infección por HPV en carcinomas epidermoides de laringe e hipofaringe	103
III. Valor de p16 como marcador de infección por HPV en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello	108
IV. Valor de p16 como marcador pronóstico en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello	118
V. Valor de p53 en el estudio de infección por HPV y como marcador pronóstico en carcinomas epidermoides de laringe, hipofaringe y orofaringe	127
6. Conclusiones	135
7. Bibliografía	139



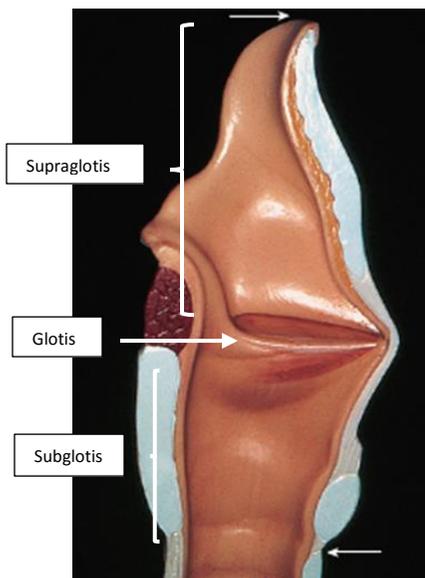
# **1. INTRODUCCIÓN**



## I. Epidemiología de los tumores de laringe, hipofaringe y orofaringe

Los tumores de cabeza y cuello suponen la quinta causa más común de cáncer a nivel mundial, con una incidencia anual estimada superior a los 500.000 casos en todo el mundo, incluyendo 274.850 casos de cáncer de cavidad oral, 159.363 casos de cáncer de laringe y 52.100 casos de cáncer de orofaringe<sup>(1)</sup>. En el año 2013 se estimó una incidencia superior a 53.000 casos y 11.000 muertes solo en EEUU por esta enfermedad<sup>(2)</sup>.

### a) Epidemiología del cáncer de laringe



**Figura 1:** corte sagital de la laringe. Jatin Shah. Head & Neck Surgery and Oncology. 4th Edition

La laringe es un órgano único, de localización central, situado anterior a la faringe y esófago y en el cual reside la función fonatoria del ser humano. Se divide en tres regiones: supraglótica, glótica y subglótica (**Figura 1**). La región supraglótica comprende la epiglotis, los repliegues aritenopiglóticos, los aritenoides, las bandas y los ventrículos laríngeos. La región glótica consta de las cuerdas vocales y comisuras anterior y posterior. La región subglótica es el espacio que queda bajo las cuerdas vocales y se extiende hasta el borde inferior del cartílago cricoides.

El cáncer de laringe es el tumor maligno más frecuente de los tumores de cabeza y cuello en España, uno de los países con mayor incidencia, donde supone entre el 2,2% y el 4,8% de todos los cánceres nuevos diagnosticados, y entre el 1,5% y el 2,5% de las muertes producidas por tumores malignos<sup>(3)</sup>. En una serie de 2500 carcinomas de cabeza y cuello publicada en nuestro país en 2001 suponen un 51,9% del total<sup>(4)</sup>.

Es un cáncer evitable, y tiene un excelente pronóstico cuando es tratado en estadios iniciales, por lo que es imprescindible insistir en prevenir el consumo de tabaco y alcohol (los dos principales factores de riesgo), y en el diagnóstico precoz.

El 99% son carcinomas epidermoides, y el grupo de pacientes más afectado son los varones (95%) en la sexta década de la vida. La localización más frecuente es la glotis (60-65% del total), seguida de la supraglotis (30-35%) siendo menos frecuentes a nivel de subglotis (5%).

El cáncer de laringe presenta su máxima incidencia en los países mediterráneos, sobre todo cuando se analizan las cifras en varones. En el Norte de Europa es donde se halla la mayor incidencia en el sexo femenino. Estas variaciones, reflejan los distintos hábitos de tabaquismo y consumo de alcohol en las distintas zonas geográficas<sup>(3,5)</sup>.

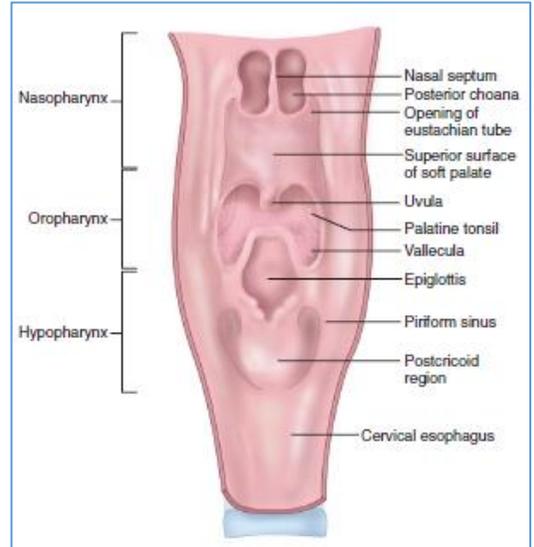
## b) Epidemiología del cáncer de hipofaringe

La hipofaringe es la región más inferior de la faringe comenzando a nivel del borde de la epiglotis y finalizando a nivel del borde inferior del cartílago cricoides, donde se continúa con el esófago cervical. Los senos piriformes, la pared posterior faríngea y el área postcricoidea son las tres sublocalizaciones que comprende la hipofaringe (**Figura 2**).

Los tumores de hipofaringe son tumores relativamente frecuentes, aunque presentan notables variaciones entre países. La incidencia en España es aproximadamente 2 casos nuevos en varones por 100.000 habitantes/año y 0,2 casos nuevos en mujeres por 100.000 habitantes/año.

En una serie publicada de 2500 tumores de cabeza y cuello diagnosticados en nuestro país entre 1984 y 1998, la hipofaringe fue la cuarta localización en importancia con el 9% de los carcinomas (225 casos)(4).

Son consideradas regiones de alto riesgo para el cáncer de hipofaringe el centro y sur de Europa, Brasil y partes de Extremo Oriente y África subsahariana(6-8). Varios estudios han mostrado la influencia de la raza y el sexo en el cáncer de hipofaringe, siendo más altas las tasas de incidencia en varones y en la raza negra(9).

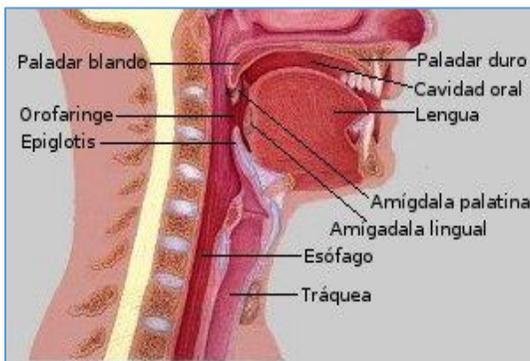


**Figura 2:** corte coronal de la faringe. Jatin Shah, Head & Neck Surgery and Oncology, 4th Edition.

La mayoría de tumores de hipofaringe son también carcinomas epidermoides, y menos de un 2% de los tumores originados a este nivel presentan otras histologías.

### c) Epidemiología del cáncer de orofaringe

La orofaringe comienza en la cara anterior del pilar anterior amigdalino y se extiende en sentido posterior. Incluye el paladar blando, la fosa amigdalina, la pared posterior faríngea y el tercio posterior de la lengua (base de lengua, por detrás de la “V” lingual) (**Figura 3**).



**Figura 3:** corte sagital de la orofaringe.  
Jatin Shah. Head & Neck Surgery and Oncology, 4th Edition

Los tumores de orofaringe son descritos clásicamente como el tercer tumor más frecuente de los localizados en cabeza y cuello, tras laringe y cavidad oral. En una serie extensa publicada en nuestro país en 2001 suponen un 17,7% del total(4). Son más frecuentes en

la quinta década de la vida y tienen una distribución por sexos muy predominante en varones (16/1).

Históricamente los tumores de base de lengua eran los más frecuentes dentro de la orofaringe, seguidos por amígdala y paladar blando. Esta distribución en cuanto a frecuencia global de tumores de orofaringe, y a frecuencia relativa dentro de las sublocalizaciones anatómicas ha cambiado, como veremos, a lo largo de las últimas dos décadas por la aparición de nuevos factores de riesgo que han tomado gran importancia.

## II. Etiología y factores de riesgo clásicos

En cuanto a la etiología, los factores y mecanismos implicados no son del todo conocidos, aceptándose la teoría multifactorial de la carcinogénesis.

El consumo de tabaco y de alcohol son los principales factores de riesgo para desarrollar un cáncer de laringe, hipofaringe y orofaringe.

El tabaco es el principal agente relacionado con el cáncer de laringe. El humo del tabaco contiene agentes cancerígenos como hidrocarburos aromáticos policíclicos y nitrosaminas, que suman su acción al efecto irritativo local y de inflamación crónica que ejerce sobre la mucosa laríngea<sup>(10)</sup>. En el caso de los tumores de orofaringe, así como en los de cavidad oral, el tabaco mascado también se ha mostrado como un importante factor de riesgo, prueba de ello es la mayor incidencia de estos tipos de tumores que se viene observando de forma clásica en el sudeste asiático y Australia.

El alcohol es un co-carcinógeno que en el caso del cáncer de laringe potencia su desarrollo facilitando la acción carcinogénica del tabaco, aunque parece que en los casos en los que afecta a la supraglotis podría comportarse mas como carcinógeno directo<sup>(11)</sup>. Además de actuar como disolvente de agentes cancerígenos del humo del tabaco, el etanol parece intervenir en los microsomas hepáticos comprometiendo el metabolismo de dichas sustancias carcinogénicas<sup>(12)</sup>.

Mientras que el consumo de tabaco influye por igual para todas las sublocalizaciones del cáncer de laringe, el consumo de alcohol se relaciona en mayor medida con los tumores laríngeos de localización supraglótica y con los

tumores de hipofaringe y orofaringe, siendo menor la asociación hallada con los tumores de glotis y subglotis<sup>(11,12)</sup>.

Hasta 2001, la incidencia de tumores de cabeza y cuello diagnosticados en nuestro medio no relacionados con los factores de riesgo clásicos suponía tan solo un 4% en laringe y orofaringe y un 1% en hipofaringe<sup>(4)</sup>.

Aparte de estos dos factores de riesgo suficientemente contrastados, se ha relacionado el cáncer de laringe y faringe con determinadas sustancias de exposición laboral (asbesto, níquel, polvo de madera, polvo de cemento...)<sup>(10,13)</sup>, carencias vitamínicas y déficits nutricionales<sup>(14)</sup>.

Existen estudios que han relacionado el reflujo gastroesofágico<sup>(15)</sup> con el desarrollo de cáncer de laringe, una vez corregido el efecto de alcohol y tabaco, aunque esta hipótesis no está suficientemente contrastada<sup>(16)</sup>.

Tan solo un 20-30% de los individuos sometidos a estos factores de riesgo desarrolla un cáncer de laringe, hipofaringe u orofaringe por lo que debe existir una susceptibilidad individual al efecto carcinogénico de los mismos, que vendría genéticamente determinada<sup>(17,18)</sup>.

### **III. Un vuelco epidemiológico**

En las últimas tres décadas ha habido un cambio importante a nivel mundial en la epidemiología del cáncer de cabeza y cuello. Mientras la exposición a mutágenos químicos como tabaco y alcohol permanecía como el factor de riesgo más común para el desarrollo de estos tumores, en este periodo de tiempo ha habido una rápida e intensa expansión epidemiológica de un subtipo de tumores de cabeza y cuello no relacionados con los factores de riesgo clásicos, y que ha adquirido una dimensión global. Estos tumores, son los relacionados con la infección por el virus del Papiloma Humano (HPV).

En las últimas tres décadas, a pesar del descenso en las tasas de tabaquismo en países desarrollados, ha habido un estancamiento, seguido de un sensible incremento en la incidencia de cáncer de orofaringe, particularmente entre varones blancos de mediana edad, muy a menudo no fumadores ni bebedores, o no grandes fumadores, en comparación con los pacientes tradicionalmente asociados a este tipo de tumor y al resto de tumores de cabeza y cuello (pacientes grandes fumadores y bebedores). Este vuelco epidemiológico hoy se atribuye a la infección por el virus del Papiloma Humano (HPV), el virus esencial en la etiología del carcinoma de cérvix uterino<sup>(19)</sup>.

#### **IV. El virus del Papiloma Humano: papel en los CECC**

El virus del Papiloma Humano (HPV, del Inglés Human Papillomavirus), descubierto en 1950, es un virus de ADN, sin envoltura, pequeño, que infecta células de epitelios escamosos. Se han aislado más de 200 tipos de HPV, y existen evidencias de la existencia de algunos tipos no aislados aún.

Los diferentes tipos de HPV dan lugar a un largo espectro de lesiones epiteliales, la mayoría de ellas consistentes en hiperplasias epiteliales benignas (verrugas o papilomas) con un bajo potencial maligno. Existe un subgrupo de HPV's denominados "de alto riesgo" que se asocian con la aparición de lesiones cancerosas en diferentes epitelios.

En el año 2003 Muñoz et al<sup>(20)</sup> clasificaron los diferentes genotipos aislados de HPV, estableciendo como HPV de alto riesgo los tipos 16, 18, 31, 33, 45, 51,52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82, por ser detectables en lesiones intraepiteliales de alto grado o carcinomas invasivos; los HPV 26, 53 y 66 como potencialmente de alto riesgo pero con un papel oncogénico peor establecido y los HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61,70 72, 81 y 89 como de bajo riesgo oncogénico.

Las infecciones por HPV de alto riesgo son asintomáticas y la gran mayoría de los individuos expuestos aclaran la infección y nunca desarrollan un carcinoma. Una pequeña fracción de las personas infectadas con estos HPV de alto riesgo desarrollará un tumor maligno, normalmente años después de la infección inicial.

La exposición al HPV es muy común, con una prevalencia puntual estimada en muestras genitales del 43-62% y una prevalencia a lo largo de la vida del individuo muy alta<sup>(21,22)</sup>. Es transmitido por contacto sexual y contacto íntimo piel con piel. La literatura muestra que en un momento puntual, el 7% de la

población tiene una infección oral u orofaríngea por HPV<sup>(23,24)</sup>. La mayoría de las infecciones son eliminadas por el sistema inmune pero solo la mitad de los pacientes con una infección conocida por HPV en cualquier lugar del organismo desarrollan anticuerpos anti-HPV. La tasa de exposición oral al virus a lo largo de la vida es desconocida, pero se estima que del 65-100% de los adultos activos sexualmente han estado expuestos al HPV en alguna localización anatómica (oral- orofaríngea, genital o anal)<sup>(21,22)</sup>.

Los varones tienen una mayor probabilidad de presentar una infección oral por el virus<sup>(24)</sup>. Esto se explica porque la mucosa genital femenina presenta una mayor carga viral que la mucosa o piel genital masculina y por tanto en una relación sexual oral el hombre tiene una exposición mayor al virus.

Basándose en evidencias moleculares y epidemiológicas, la International Agency for Research on Cancer, reconoció en 1995 que los HPV tipos 16 y 18, considerados de alto riesgo, eran carcinogénicos en humanos<sup>(25)</sup>. Juntos, esos dos tipos de HPV son responsables del 70% de los casos de cáncer de cuello de útero<sup>(26)</sup>, siendo esta neoplasia, la más fuertemente asociada a la infección por HPV. Los HPV 16 y 18 además se asocian con otros tumores anogenitales (vulvar, anal y cáncer de pene)<sup>(27)</sup>, y lo que más nos interesa en relación con el presente trabajo, con algunos carcinomas epidermoides de cabeza y cuello (CECC)<sup>(28)</sup>.

Evidencias clínicas, epidemiológicas y moleculares muestran que la infección por HPV's de alto riesgo especialmente HPV 16 se relaciona con el desarrollo de carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) en individuos sin exposición a los factores de riesgo clásicos para esta enfermedad (consumo de tabaco y de alcohol)<sup>(29,30)</sup>.

La incidencia de cáncer de amígdala y base de lengua en EEUU se incrementó un 2,1% y un 3,9% respectivamente, desde 1973 a 2001 en varones y mujeres

de raza blanca de entre 20 y 44 años<sup>(31,125)</sup>. Este incremento en la incidencia de cáncer orofaríngeo ha sido paralelo al incremento de ciertas prácticas sexuales en la población típicamente asociadas a la transmisión sexual del HPV<sup>(30,31)</sup>. Valga como ejemplo un estudio francés, que muestra que la prevalencia a lo largo de la vida de relaciones sexuales orales se ha incrementado en la población desde un 50% en 1970, a un 90% en 2006<sup>(32)</sup>.

Varios estudios sugieren que la infección del epitelio de la mucosa orofaríngea por el HPV es transmitida sexualmente, y que el riesgo de infección oral por HPV aumenta con un mayor número de parejas sexuales y con un mayor número de parejas sexuales orales a lo largo de la vida. Esto se confirma en un estudio caso-control del año 2007 que demuestra que el riesgo de cáncer orofaríngeo (OPSCC) aumenta de forma significativa en individuos con un alto número de parejas sexuales vaginales (>26) y de parejas sexuales orales (>6) con unos Odds Ratio de 3,1 y de 3,4 respectivamente<sup>(30)</sup> concluyendo que hay una fuerte asociación entre los hábitos sexuales, la infección por HPV y el riesgo de OPSCC en pacientes sin historia de tabaquismo o consumo de alcohol<sup>(30,33)</sup>.

Del mismo modo, marcadores de infección por HPV como la seropositividad para HPV-16 L1 y E6 se han asociado con un incremento del riesgo de OPSCC<sup>(34)</sup>.

En 1983 fue propuesto por primera vez el HPV como un factor etiológico en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello por Syrjanen et al, en tumores de cavidad oral<sup>(35,36)</sup> y en 1985 fue detectado por primera vez el ADN del HPV 16 en un carcinoma invasivo de cabeza y cuello<sup>(37)</sup>. Desde entonces, las secuencias de ADN de HPV 16 han sido detectadas repetidamente en una proporción variable de CECC que va desde el 10% al 100%<sup>(38)</sup>. Esta disparidad

parece reflejar las diferentes localizaciones anatómicas de los tumores estudiados y las distintas técnicas usadas para aislar el ADN viral.

Análisis retrospectivos han demostrado el claro cambio en la epidemiología de los CECC en EEUU en las últimas 4 décadas. Entre 1973 y 2003, se ha observado una reducción del 1,85% anual en la incidencia de CECC asociados a los factores de riesgo clásicos, paralelamente al aumento en la incidencia de los CECC asociados al HPV de un 0,8% anual<sup>(39)</sup>. Esto ha sido paralelo al descenso en las tasas de tabaquismo durante el periodo<sup>(40)</sup>.

El incremento en los tumores asociados al HPV ha sido tan importante que algunos autores han llegado a plantear la existencia de una epidemia en cuanto a la distribución del virus HPV. En un estudio publicado sobre la prevalencia de infección por HPV en 271 casos de OPSCC entre 1984 y 2004 en USA, se observa un incremento temporal desde un 13,6% en la década de los 80's hasta un 72,7% en los 2000<sup>(41)</sup>.

En una revisión sistemática publicada en 2005<sup>(42)</sup> se recoge que la prevalencia de infección por HPV en OPSCC era del 35,9% a nivel mundial, y que esta prevalencia era mucho mayor en USA (47%), que en Europa (28%). Tres años después, se publica una nueva revisión<sup>(43)</sup> en la que se muestra un pequeño cambio en la prevalencia de infección por HPV en OPSCC hasta un 38,1%. Estudios más recientes, sin embargo, sugieren un aumento importante en la prevalencia de infección por HPV en estos tumores. Un estudio retrospectivo sueco, muestra un progresivo incremento en las cifras de detección de HPV en carcinomas epidermoides de amígdala usando el mismo método de detección, a lo largo de las últimas tres décadas: 23,3% en 1970's, 29% en 1980's 57% en 1990's, 68% entre 2000 y 2002, 77% entre 2003 y 2005 llegando a un 93% entre 2006 y 2007<sup>(44)</sup>.

Un estudio publicado en The New England Journal of Medicine en 2010 recoge una prevalencia de HPV en carcinomas de orofaringe del 63,5% en 323 pacientes<sup>(45)</sup>.

A pesar del gran énfasis que ha puesto la comunidad científica internacional en la implicación de la infección por HPV en la etiología de los carcinomas epidermoides de orofaringe (OPSCC) y en el aumento en la incidencia de este tipo de tumor, los datos publicados sobre la presencia del virus en otros tumores de cabeza y cuello muestran unas cifras mucho menores. Una revisión de 60 estudios publicados utilizando PCR para detectar y genotipar el HPV en biopsias de tumores de cabeza y cuello demuestra una mayor prevalencia de infección por HPV en OPSCC frente a carcinomas epidermoides de laringe (LSCC) y de cavidad oral (OSCC) (37,5% vs 24% vs 23,5%)<sup>(42,43)</sup>.

Un meta-análisis publicado en 2013, estima una prevalencia de infección por HPV a nivel mundial en carcinomas epidermoides de orofaringe de un 47,7%<sup>(46)</sup>.

Hay autores que hablan de la existencia de una fase de latencia para los otros carcinomas epidermoides de cabeza y cuello y preconizan un futuro incremento en las tasas de infección por HPV en los mismos en el futuro, que emule la evolución observada en los OPSCC.

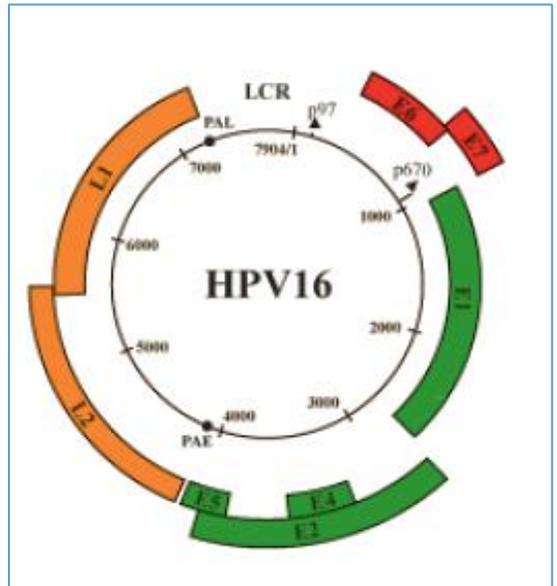
El HPV tipo 16 es el genotipo más prevalente en los tumores de cérvix uterino y también en los CECC, siendo detectado en más del 90% de los CECC HPV positivos<sup>(29)</sup>. El HPV tipo 18 es detectado solo en un 2,8% de los OPSCC HPV positivos<sup>(42)</sup>.

## V. Ciclo Biológico del HPV:

El proceso tumorigénico llevado a cabo por los HPV de alto riesgo ha sido estudiado desde el punto de vista molecular en tumores de cérvix uterino.

El genoma del HPV está contenido en una molécula de ADN circular, de doble cadena, de un tamaño de 8000 pb que codifica más de 10 proteínas, unas denominadas de traducción temprana (E), y otras de traducción tardía (L). Solo una de las dos cadenas es transcrita a ARNm.

El genoma se divide en tres porciones (**Figura 4**): una región de 4000 pb que codifica proteínas implicadas en la replicación del ADN viral y en la transformación celular (región E), una



**Figura 4:** genoma del HPV 16  
Figura tomada de Ref. 91

región de 3000 pb que codifica las proteínas estructurales de las partículas virales (región L), y una región de 1000 pb no codificante que contiene elementos iniciadores de la replicación del ADN viral y elementos reguladores de la transcripción<sup>(47)</sup>.

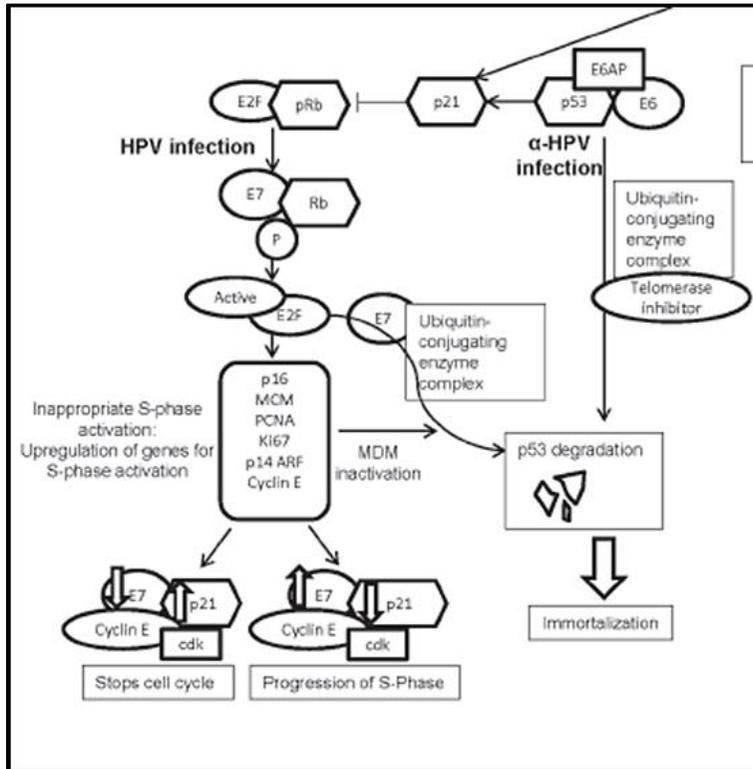
A través de heridas o abrasiones el HPV infecta las células epiteliales basales, que son las únicas del epitelio con capacidad de replicarse. Tras la infección el ADN viral se mantiene en el núcleo de las células basales infectadas en forma de un bajo número de copias en forma de plásmido<sup>(48)</sup>, sin que se produzca la integración del ADN del virus en el genoma celular.

Las células epiteliales realizan un proceso de diferenciación a medida que se desplazan desde la membrana basal hacia la superficie del epitelio. Este proceso de diferenciación lleva asociado la pérdida de capacidad de replicación, algo característico de los queratinocitos diferenciados de los estratos superficiales.

Es durante este proceso cuando el ADN viral se replica hasta dar lugar a un gran número de copias en las células, ya diferenciadas, que se encuentran cerca de la superficie epitelial<sup>(49)</sup>. En estas células superficiales es donde se produce la transcripción y traducción de los genes de la región L, que codifican las proteínas estructurales L1 y L2, que constituyen la cápside de las partículas virales y que determinan el subtipo de virus HPV. El genoma viral amplificado es encapsulado por las proteínas de la cápside para formar y liberar los provirus<sup>(50)</sup>, perpetuando así el ciclo vital del virus.

La replicación del genoma del HPV es dependiente de la maquinaria de replicación de la célula huésped. A pesar de que las células diferenciadas de los estratos suprabasales del epitelio normalmente no son capaces de permitir la síntesis de ADN, es en esas células en las que se produce la replicación del ADN viral. Esto es así debido a que las proteínas virales E6 y E7 crean en las células infectadas un estado que permite la replicación<sup>(51)</sup>.

La proteína supresora de tumores p53 actúa incrementando sus niveles en respuesta a daños en el ADN y evitando la progresión del ciclo celular hacia Fase S en el punto de control existente al final de Fase G1.



**Figura 5:** esquema de actuación de oncoproteínas E6 y E7 del HPV de alto riesgo riesgo. Figura tomada de Ref. 81

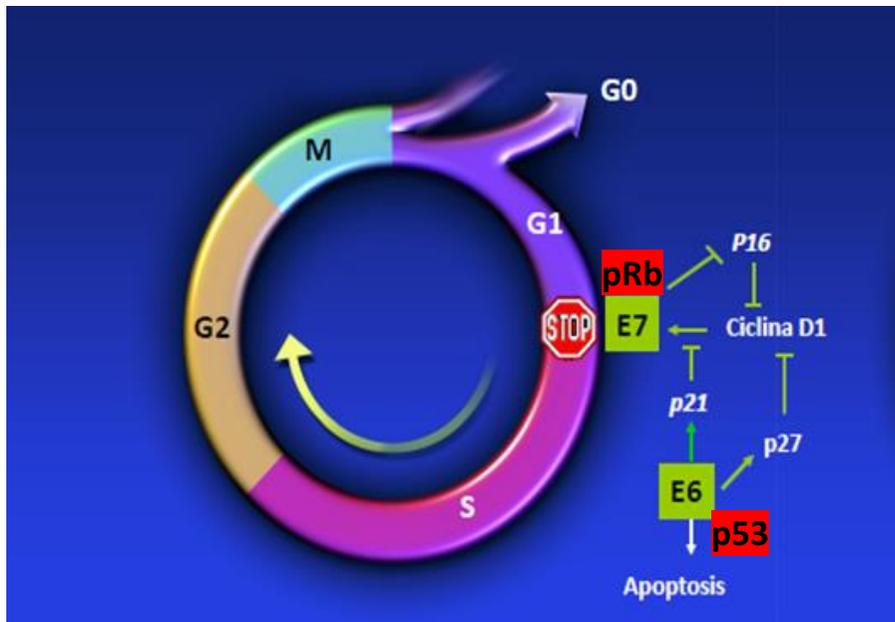
La oncoproteína E6 del HPV se une a la proteína supresora de tumores p53 e induce su degradación mediante un proceso de ubiquitinización<sup>(52-54)</sup>. E6 promueve la inmortalidad de la célula a través de otros mecanismos como incrementar la actividad de la telomerasa<sup>(55)</sup>.

E2F es un factor de transcripción necesario para la síntesis de ADN, que es inhibido por la forma hipofosforilada de la proteína Rb (pRb). La existencia de señales mitogénicas en la célula produce un aumento en la actividad de quinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las cuales promueven la fosforilación de pRb, que pasa a estado hiperfosforilado. El paso a estado hiperfosforilado de Rb conduce a la liberación de E2F permitiendo a la célula la entrada en fase S.

La oncoproteína E7 del HPV se une a la proteína supresora Rb y a proteínas relacionadas, desestabilizando su función<sup>(56,57)</sup>. Fundamentalmente lo que hace es unirse a la forma hipofosforilada de Rb conduciendo a la degradación de la misma, de manera que no puede fijar el factor E2F y la célula escapa al control en G1 produciéndose el paso a la fase S de forma incontrolada<sup>(58,59)</sup> **(Figura 5)**.

La proteína p16 es un inhibidor de las CDKs, que en la célula sana se encuentra inhibido por la actividad de pRb. La degradación de pRb llevada a cabo por la oncoproteína E7 produce una sobreexpresión de p16 como efecto indirecto<sup>(60)</sup>. E7 asimismo estimula las ciclinas E y A conduciendo el ciclo a Fase S, sorteando los efectos inhibidores de la replicación que normalmente lleva a cabo p16<sup>(26)</sup> **(Figura 6)**.

E7 también se une a otras proteínas de control del ciclo celular y reparadoras del ADN (p21, otras CDK) que conducen a la célula a fase S<sup>(61)</sup>.



**Figura 6:** reentrada en ciclo celular producida por E6 y E7

Ambas, E6 y E7, interactúan con otras dianas moleculares y juntas promueven la progresión del ciclo celular propiciando la reentrada en el ciclo celular de queratinocitos diferenciados postmitóticos, permitiendo así la replicación del ADN viral en queratinocitos diferenciados<sup>(62,63)</sup>.

La expresión continuada de los genes E6 y E7, provoca inestabilidad genómica, debida en parte a la capacidad de las oncoproteínas virales de anular las vías moleculares de los genes supresores de tumores. Además E6 interfiere con las enzimas reparadoras del ADN y E7 puede producir alteraciones cromosómicas estructurales y numéricas interfiriendo en la síntesis del centrosoma<sup>(64,65)</sup>.

Las proteínas E1 y E2 son también necesarias para la replicación del ADN viral. E1 es una helicasa dependiente de ATP que inicia la replicación viral en

cooperación con E2. E2 puede actuar como represor de la transcripción de E6 y E7, y tiene un papel esencial en la segregación de los plásmidos virales<sup>(66,67)</sup>.

## VI. Diferencias entre HPV de alto y bajo riesgo carcinogénico

El efecto de desestabilización de los mecanismos de control del ciclo celular mediado por las oncoproteínas virales, no se produce en la misma medida en todos los HPV.

En las infecciones por HPV de bajo riesgo la expresión de E6 y E7 es controlada de forma estricta y eficaz, manteniendo unos niveles de expresión en las células basales infectadas muy baja. Esta baja expresión tan solo limita la diferenciación de las células basales para mantener un reservorio de infección y conduce a las células de los estratos suprabasales a un estado que permite la replicación con el objetivo de llevar a cabo la amplificación de su genoma y completar su ciclo vital, pero no conduce a la división celular<sup>(68,69)</sup>.

La expresión de E6 y E7 en estas células basales no está del todo clara, y aunque se cree que se produce expresión a bajo nivel<sup>(70)</sup>, la expresión de E1 y probablemente E2 sería suficiente para el mantenimiento del genoma viral plasmidico en la capa basal epitelial<sup>(71)</sup> y para facilitar la correcta segregación del genoma viral durante la división celular<sup>(77,78)</sup>.

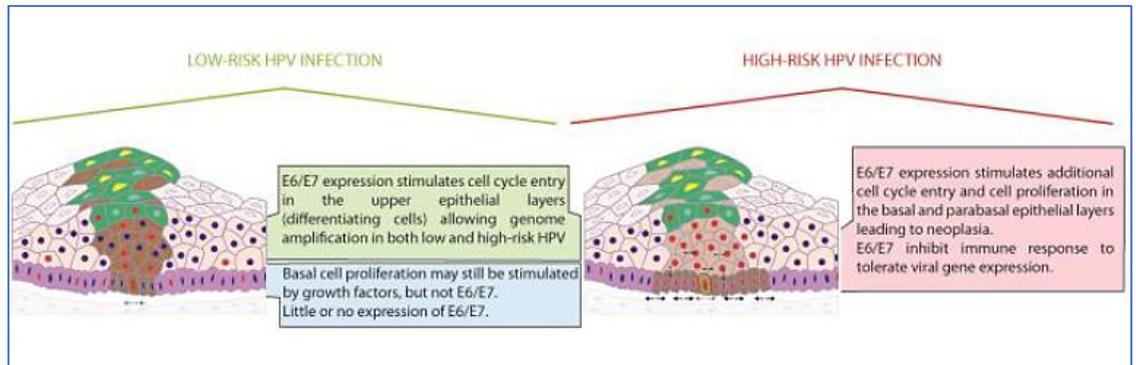
De esta forma en las infecciones por HPV de bajo riesgo no se estimula la proliferación celular basal y parabasal de forma importante (**Figura 7**). E1 y E2, se mantienen en niveles de expresión altos<sup>(72-76)</sup> por activación de su promotor específico, y logran la cooperación entre célula huésped y virus para replicar los plásmidos virales. E2 es un importante represor de la expresión de E6 y E7, por lo que su nivel de expresión es fundamental para el control de dichas oncoproteínas. No está del todo claro si existe una limitada replicación del ADN de la célula huésped paralelo a la amplificación viral, aunque existen

trabajos que sugieren que al igual que para otros virus, la replicación celular está inhibida<sup>(79-80)</sup>.

En las infecciones de bajo riesgo, tras la fase de infección productiva, el sistema inmune del huésped fundamentalmente a través de la respuesta celular adaptativa mediada por los linfocitos T, logra aclarar la infección, pudiendo persistir una infección crónica con muy baja carga viral, y sin expresión de proteínas virales en un número reducido de células basales infectadas (latencia)<sup>(81)</sup>.

En las infecciones por HPV de alto riesgo se estimula la proliferación de las células basales infectadas y se inhibe la diferenciación de las mismas (**Figura 7**). Se produce una desregulación de la expresión génica viral, que lleva a una sobreexpresión de E6 y E7 progresivamente cada vez más intensa, con las consecuentes alteraciones a nivel de sus dianas intracelulares p53 y pRb. De este modo, se acumulan anomalías cromosómicas y mutaciones puntuales en la célula basal infectada, que son las que van dando lugar al fenotipo neoplásico<sup>(64)</sup>.

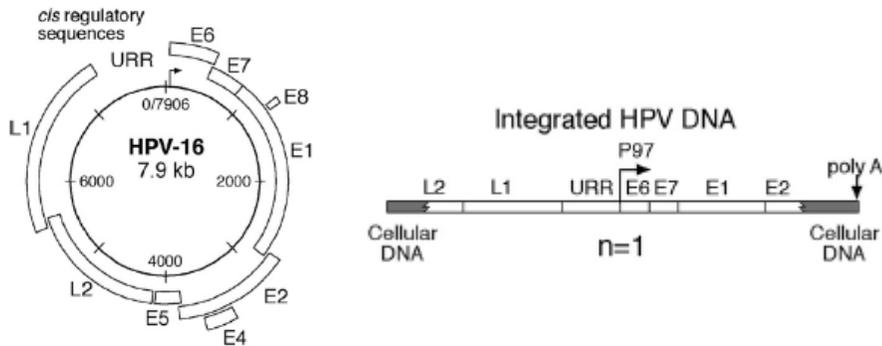
En la mayoría de los casos, el proceso carcinogénico HPV-mediado implica el mantenimiento de una expresión alta constante de E6 y E7. Varios estudios han demostrado que la inhibición específica de E6 en líneas celulares de cáncer HPV-mediado conduce a la apoptosis celular<sup>(82,83)</sup>.



**Figura 7:** diferencias entre HPV de alto y bajo riesgo carcinogénico Figura tomada de Ref. 91

Uno de los factores que contribuyen a la desregulación de la expresión del genoma de los HPV de alto riesgo es que en ellos se produce la integración del genoma viral en el ADN de la célula huésped. El proceso por el que se desencadena la integración del plásmido viral no se conoce por completo, pero se cree que la desregulación del genoma viral que se produce en los HPV de alto riesgo, contribuye a ello. El fallo en la expresión de E1 se ha visto en cultivos celulares que evita el mantenimiento del estado plasmídico y conduce a la integración del genoma viral en el ADN de la célula huésped<sup>(84)</sup>.

Para la integración, el genoma viral circular casi invariablemente se linealiza a nivel de la región E1-E2, dando como resultado la delección de una parte o de todas las secuencias de E1 y/o E2. Los genes E6 y E7, y en la mayoría de los casos, la región de control larga (LCR) que contiene la mayoría de las señales reguladoras necesarias para las actividades biológicas del genoma viral, se mantienen en la sección de ADN viral integrada (**Figura 8**).



**Figura 8:** esquema de linealización del genoma plasmídico del HPV de alto riesgo previo a la integración en el cromosoma de la célula huésped Figura tomada de Ref. 85

En estudios en líneas celulares de cáncer de cuello de útero se ha observado que estas secuencias integradas se expresan, dando lugar a oncoproteínas E6 y E7 a partir de ARNm's quiméricos célula huésped-virus<sup>(85)</sup>. Como fruto de la integración viral se va perdiendo la represión que ejerce E2 a la expresión de E6 y E7, progresivamente los niveles de estas aumentan<sup>(86)</sup>. Del mismo modo, la pérdida de la función de E1, continúa favoreciendo la integración de los plásmidos, los cuales cada vez suponen una menor cantidad del genoma viral. Las secuencias integradas de HPV-16 pueden ser contiguas, o pueden contener deleciones internas, duplicaciones o reordenamientos de secuencia, lo cual intensifica la desregulación de la expresión génica viral.

Asimismo la integración del HPV-16 conduce a la deleción de algunas secuencias cromosómicas e inevitablemente da como resultado una desestabilización cromosómica y produce cambios en la expresión génica de la célula huésped que pueden suponer pérdidas o ganancias de función potencialmente carcinogénicas<sup>(86-87,94)</sup>. El mecanismo de la integración del HPV no está claro, pero se piensa que involucra un paso de recombinación insercional de tipo no-homólogo utilizando parches cortos de secuencias

homólogas entre el genoma viral y el sitio de integración cromosómica para estabilizar de forma transitoria la secuencia integrante.

Además los HPV de alto riesgo, parece que son capaces de evadir el control del sistema inmunológico alterando la vía de respuesta al interferón, reduciendo la expresión de los genes del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de tipo I y alterando la producción de antígenos virales<sup>(88)</sup>. Se ha observado en estudios que estos virus también reducen la expresión de genes con funciones en el reconocimiento de patógenos intracelulares y en la detección de ácidos nucleicos no propios como *TLR3*, *RIG-1* y *MDA5*<sup>(89)</sup>. La expresión de los TLR se incrementa en las lesiones en proceso de regresión y para TLR9 se ha observado una respuesta diferencial entre la infección por virus de alto y bajo riesgo<sup>(90)</sup>.

Hoy día sabemos además, que E6 y E7 se regulan de forma diferente tanto a nivel de expresión génica, como a nivel de su función en los HPV de alto y bajo riesgo carcinogénico. En estos HPV de bajo riesgo E6 y E7 tienen un promotor específico para cada gen, mientras que en los HPV de alto riesgo su ratio de expresión se determina por “empalme alternativo” lo cual hace más fácil la desregulación<sup>(91)</sup>. Asimismo, en los HPV de bajo riesgo, E6 no es capaz de incrementar la actividad de la telomerasa, y E7, aunque sí se une a Rb, no es capaz de producir su degradación<sup>(92)</sup>. La activación de la telomerasa es un paso fundamental en la inmortalización celular llevada a cabo por HPV en estudios in vitro<sup>(93)</sup>, por lo que la ausencia de dicha capacidad en los HPV de bajo riesgo supone una merma muy importante de su potencial oncogénico. Asimismo, la falta de esta capacidad hace mucho más difícil su estudio en modelos celulares, de lo que se deriva el peor conocimiento de los mecanismos implicados en el ciclo vital de estos virus<sup>(91)</sup>.

## VII. Implicaciones clínicas de los tumores asociados al HPV

Fruto de la inactivación de las vías moleculares de p53 y de pRb mediada por las oncoproteínas virales E6 y E7, se obvia la inactivación mutacional de los genes *TP53* y *RB1* en los CECC asociados al HPV. De esta manera, el HPV se relaciona con CECC sin alteraciones en los genes *TP53* y *RB1*, pero que presentan bajos niveles de las proteínas p53 y pRb<sup>(95)</sup>. Por el contrario, la proteína supresora tumoral p16 (codificada por el gen *CDKN2A*) está sobreexpresada en los CECC asociados al HPV debido a la pérdida de inhibición que ejerce pRb sobre él<sup>(96)</sup>.

Por el contrario, los CECC asociados a los factores de riesgo clásicos (tabaco y alcohol), se relacionan con disminución de la expresión de p16 y con estados mutados del gen *TP53* (que suele manifestarse como sobreexpresión de la proteína p53)<sup>(97)</sup>. El daño oncogénico clásico es atribuido al exceso de exposición a tabaco y alcohol, que provoca una inactivación mutacional de *TP53* y *RB1* de forma progresiva en múltiples pasos transformando el epitelio normal en uno displásico y finalmente produciendo un carcinoma<sup>(98)</sup>.

Un elemento diferenciador importante entre ambos tipos de tumores se halla en el estado de expresión de la proteína p16. La sobreexpresión de p16 ha sido hallada de forma repetida en numerosos estudios como marcador de asociación con el HPV, en cambio la pérdida de expresión de dicha proteína es un evento carcinogénico temprano en los CECC asociados a tabaco y alcohol<sup>(99)</sup>.

La detección del ADN del HPV en las células tumorales no prueba asociación causal, ya que solo el ADN transcripcionalmente activo es biológica y clínicamente relevante. Por tanto, debe demostrarse la expresión del ARNm

de E6 o E7, lo que es técnicamente complejo. Sin embargo, la sobreexpresión de p16 en tumores HPV-positivos se asocia a actividad transcripcional del ADN viral, y por tanto a relación etiológica entre la infección y el desarrollo del tumor<sup>(100)</sup>. Por ello la expresión de p16 se suele emplear como un marcador indirecto de infección por el HPV, aunque no todos los casos p16-positivos tienen infección por el HPV.

Diferenciando tumores HPV-negativo/p16 no expresada, HPV-positivo/p16 no expresada y HPV-positivo/p16 sobreexpresada, este último grupo tiene una supervivencia a los 5 años del 79% (frente a 20% y 18% de los otros dos grupos) y una recurrencia local del 14% (frente al 45% y 74%), por lo que el pronóstico de los tumores relacionados con el HPV es significativamente mejor, reduciéndose el riesgo de muerte entre un 60 y un 80%<sup>(95,100)</sup>.

El mejor pronóstico que presentan los tumores asociados con el HPV puede ser atribuido a la ausencia de “cancerización del campo”, algo que si presentan los tumores asociados a los factores de riesgo clásicos, y que consiste en múltiples insultos genéticos tempranos en múltiples células epiteliales sometidas al influjo carcinogénico constante del hábito tabáquico y del alcohol, y que permite el desarrollo de tumores multifocales<sup>(101)</sup>. Además, la respuesta apoptótica inducida por los agentes quimioterápicos y las radiaciones parece estar intacta en los tumores asociados al HPV, ya que no hay mutación inactivadora de los genes *TP53*, *RB1* ni de las vías que estos controlan<sup>(101-102)</sup>.

Los CECC asociados a tabaco y alcohol son más frecuentes en varones, mientras que varones y mujeres tienen el mismo riesgo de desarrollar un CECC asociado al HPV. Además los individuos que desarrollan un CECC asociado al HPV son a menudo no fumadores ni bebedores y una media de 5 años mas jóvenes que los sometidos a los factores de riesgo clásicos<sup>(103)</sup>.

Los CECC asociados al HPV presentan unas características clínicas diferenciadoras: en un estudio en carcinomas de orofaringe se observó que los tumores primarios tienden a ser más pequeños que los relacionados con el tabaco (T1-T2 49% vs T3-T4 20%;  $p=0,001$ ), presentan una mayor extensión N ( $p=0,001$ ) y suelen aparecer en individuos sanos (ECOG=0;  $p=0,002$ )<sup>(104)</sup>.

El Princess Margaret Hospital estudió la tasa de metástasis a distancia en tumores de orofaringe tras tratamiento con quimio-radioterapia, observando una mucho menor tasa de M+ en los tumores HPV-positivos. La supervivencia a 2 años tras aparición de metástasis en los tumores HPV-positivos fue de un 11% frente a un 4% para los tumores HPV-negativos<sup>(105)</sup>.

Esta misma institución en 2013 realizó un estudio sobre 493 casos de CECC N2-3 tratados entre 2003 y 2009, hallando que las metástasis ganglionares en los tumores HPV-positivos eran de mayor tamaño (2,9 vs 2,5 cm), con mayor probabilidad eran quísticas (38% vs 6%) y respondían mejor al tratamiento tras 36 semanas (90% vs 70%)<sup>(106)</sup>.

## VIII. Métodos de detección de HPV

Actualmente no existe un método estándar para detectar el HPV en muestras obtenidas de la práctica clínica. Las estrategias existentes varían tanto en el diseño, como en las dianas a las que se dirigen:

- ADN de HPV
- ARNm de E6 y E7 (post-integración y transcripción del ADN)
- Oncoproteínas virales E6 y E7 (post-traducción del ARNm viral)
- Alteración de la expresión de proteínas celulares (como la sobreexpresión de p16)

El valor de un test de detección de HPV reside en su capacidad de detectar la presencia de HPV y reconocer su papel clínicamente relevante en el proceso tumorigénico. Un test puede ser muy sensible para detectar la presencia de trazas de ADN de HPV, pero no tiene valor clínico si no es capaz de distinguir una infección incidental (virus contaminante), de un agente oncológico activo. La detección de productos de la actividad transcripcional del ADN del virus es considerado como el método de detección “Gold Standard” de un virus HPV con un papel tumorigénico. En ausencia de métodos inmunohistoquímicos de detección de E6 y E7, la detección de sus transcritos a ARNm es el estándar frente al cual la sensibilidad y especificidad de otros métodos de detección es establecida.

Hasta ahora la detección de ARNm de E6 y/o E7 requería la extracción del ARN de tejido fresco o congelado y su amplificación mediante PCR, técnica compleja y solo realizable en laboratorios de investigación, por lo que no es aplicable a la práctica clínica diaria. El objetivo de la comunidad internacional

ha sido encontrar un test con la fiabilidad y reproducibilidad de dicho método, pero usando técnicas menos complejas y trasladables al laboratorio diagnóstico disponible en la práctica clínica.

### **a) Detección de ADN de HPV mediante PCR**

La amplificación de ADN mediante PCR (del Inglés Polymerase Chain Reaction), o Reacción en cadena de la Polimerasa, es una técnica capaz de amplificar secuencias de ADN específico contenido en una muestra biológica que contiene tipos celulares heterogéneos. La prueba puede orientarse a amplificar secuencias de ADN altamente conservadas y compartidas por múltiples tipos de HPV, o a secuencias específicas de ADN que permitan el genotipado del virus presente en la muestra. Es la prueba que muestra una mayor sensibilidad: puede detectar secuencias de ADN de HPV que estén presentes en una cantidad hasta de una copia de genoma viral por célula.

Los inconvenientes de la técnica son la gran facilidad de contaminación cruzada de las muestras que requieren de una manipulación meticulosa en el laboratorio, incluyendo una separación física del lugar donde se procesan muestras orofaríngeas y ginecológicas. Además no permite evaluar la relevancia clínica o biológica del virus<sup>(107)</sup>. No permite saber si el virus está actuando como promotor de la transformación maligna o si es un virus transcripcionalmente silente que no ha influido en el proceso tumorigénico. Este problema ha sido puesto de manifiesto en estudios que han mostrado la discordancia significativa entre la detección de ADN y la detección de ARNm de E6/E7 que define las infecciones clínicamente relevantes<sup>(108,109)</sup>.

La capacidad de esta técnica para detectar infecciones biológicamente relevantes podría mejorarse estableciendo unos umbrales de carga viral que

discriminasen mejor las infecciones relevantes. Estudios han mostrado que los tumores con una mayor carga viral detectada por PCR de ADN tienen una mayor probabilidad de expresar ARNm de E6/E7 y se relacionan con mejor pronóstico clínico<sup>(110,111)</sup>. Para algunos autores uno de los factores que contribuirían notablemente a mejorar el uso de esta técnica en la práctica clínica sería por tanto el establecimiento de unos umbrales de carga viral a partir de los cuales tomar la infección como clínicamente relevante<sup>(112)</sup>.

### **b) Detección de ARN de HPV mediante RT-PCR**

La detección del ARNm de E6/E7 constituye el “Gold Standard” para el diagnóstico de una infección biológicamente activa por HPV en ausencia de pruebas inmunohistoquímicas de detección de E6 y E7. Hasta hace poco era imprescindible la extracción del ARN de muestras de tejido fresco o congelado, pero su adaptación a muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina ha expandido su aplicación a muestras clínicas. No obstante, continua siendo una técnica compleja reservada para el laboratorio de investigación<sup>(109)</sup>. Conseguir su sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de HPV mediante técnicas más sencillas realizables en el laboratorio de anatomía patológica sigue siendo el objetivo a lograr.

### **c) Hibridación “in situ” (ISH) de ADN del HPV**

La hibridación “in situ” de ADN es una técnica de amplificación de señal que utiliza sondas de ADN marcadas complementarias a secuencias diana de ADN viral. Las sondas marcadas, se unen a las secuencias específicas de ADN viral tipo-específicas, a secuencias consenso compartidas por múltiples tipos de HPV, o pueden ser mixtas, en una reacción única que cubre un amplio espectro

de tipos de HPV. Dada la mayoritaria implicación del HPV 16, una ISH con sondas de ADN tipo 16-específicas, detectará más del 90% de los carcinomas asociados al HPV.

#### **d) Hibridación “in situ” (ISH) de ARNm del HPV**

Se han desarrollado en los últimos años sondas de hibridación de ARN complementarias al ARNm de E6/E7 que permiten la visualización directa de los transcritos de ADN viral en tejidos procesados. Esta prueba alcanza la sensibilidad del estudio inmunohistoquímico de p16 en muestras de carcinomas de orofaringe fijadas en formalina y embebidas en parafina y supera el de la ISH de ADN<sup>(113-116)</sup>.

Podría convertirse en un test ideal para detectar el HPV en muestras clínicas, ya que confirma la presencia de un virus integrado y transcripcionalmente activo, permitiendo la visualización de los transcritos directamente en secciones de tejido, pero aún no existe una gran difusión de la técnica.

#### **e) Tinción inmunohistoquímica de p16 como marcador de infección por HPV**

La inmunotinción de p16 se ha considerado como un marcador razonable de infección biológicamente activa por HPV<sup>(120)</sup>, basándose en la relación entre la expresión de las oncoproteínas virales y la desregulación de la vía molecular de *RB1* o como un método complementario de detección de HPV en OPSCC basándose en la alta correlación entre la detección de HPV y la sobreexpresión de p16<sup>(110,117-119)</sup>. La simplicidad, bajo coste y alta sensibilidad de la IHQ han hecho que se haya considerado el reemplazo de la ISH y PCR por dicho estudio

como un test autónomo e independiente para la detección de infección por HPV<sup>(118)</sup>. Al mismo tiempo, la ausencia de un mecanismo directo y exclusivo de relación entre la integración del ADN viral y la expresión de p16 pone en duda su uso como test único.

#### **f) Algoritmos Diagnósticos**

Las estrategias de detección multimodales buscan utilizar las fortalezas de cada test individual en combinación, para optimizar la fiabilidad en el diagnóstico del estado de la infección. Estas estrategias utilizan un algoritmo diagnóstico en varios pasos, que comienza por el estudio IHQ de p16. Aquellos tumores de orofaringe que presentan positividad para p16 son posteriormente analizados con un método de detección más riguroso como ISH<sup>(121)</sup> o PCR<sup>(109)</sup>. Otros estudios abogan por un triple método usando inmunohistoquímica de p16, PCR de ADN de HPV, e hibridación “in situ” de HPV, o inmunohistoquímica de p16 y evaluación histológica de diferenciación basaloide<sup>(120)</sup>.

Sin duda estos algoritmos permiten un análisis más fiable del estado de infección por HPV. Asimismo representan una desviación de la tendencia creciente a la simplicidad, reducción de coste y rapidez que se busca en práctica clínica diaria. Serían deseables sin duda alguna cuando no sea permisible un margen de error, como a la hora de seleccionar candidatos para una desintensificación terapéutica<sup>(112)</sup>.

### **g) Evaluación microscópica:**

Los tumores asociados al HPV tienen características microscópicas distintivas, las cuales pueden ayudar al diagnóstico de dicha asociación<sup>(123)</sup>. Los tumores HPV se originan en las criptas amigdalares. La implicación de la superficie amigdalares generalmente es un fenómeno secundario que refleja la extensión del proceso tumoral desde las criptas amigdalares colonizando la superficie epitelial. La transición entre el carcinoma escamoso asociado al HPV y el epitelio adyacente tiende a ser abrupta, sin zonas de transición que contengan lesiones epiteliales precursoras. Además la progresión histológica a través de fases secuenciales de displasia que culminan en un carcinoma in situ y finalmente en un carcinoma invasivo que caracteriza a los tumores no relacionados con el HPV generalmente no es evidente en los tumores asociados al HPV.

Cuando infiltran, lo hacen con un crecimiento de sábanas, cintas o lóbulos de células tumorales. El crecimiento invasivo del tumor no genera una reacción desmoplásica estromal importante. A pesar de ello, los nidos celulares están a menudo rodeados por una zona de células linfoides. El grado en el que esos lóbulos de células tumorales se introducen en las células linfoides, como un tumor que infiltra entre linfocitos o TILS (del inglés, Tumor Infiltrating Lymphocytes) es muy variable. Cuando los TILS son numerosos, y se rompen los lóbulos tumorales en cuerdas celulares y células individuales toma un aspecto linfoepitelial similar al del carcinoma indiferenciado de nasofaringe<sup>(124)</sup>.

A nivel citológico las células tienen una relación núcleo-citoplasma alta, un citoplasma de aspecto sincitial sin puentes intercelulares y no presentan queratinización citoplásmica<sup>(122)</sup>. Estas características celulares aportan un aspecto basaloide<sup>(123,120)</sup>. En las metástasis ganglionares, la presencia de

degeneración quística es un hallazgo común que a veces parece remedar la formación de criptas amigdalares<sup>(124)</sup>.

Las características morfológicas macro y microscópicas de los tumores orofaríngeos asociados al HPV están presentes de forma consistente y deben ser un elemento a considerar a la hora de iniciar los estudios de detección de HPV e incluso de interpretar sus resultados. Atendiendo a esto sería planteable repetir el test utilizado o elegir modalidades alternativas de estudio de detección de HPV si se encuentran resultados contradictorios entre las pruebas de detección y los hallazgos histológicos<sup>(112)</sup>.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **A. Hipótesis:**

Existen ciertos tumores de orofaringe que guardan una relación etiológica con el HPV, pero no se conoce la proporción de tumores de orofaringe atribuibles a esta etiología en la población asturiana y los datos relativos al resto de España son muy escasos. Por otra parte, también se ha relacionado, aunque de forma menos consistente, la infección por el HPV con un subgrupo de carcinomas de laringe e hipofaringe, no existiendo tampoco datos en la población asturiana ni española. Sería de esperar que el porcentaje de casos de carcinomas de estas localizaciones en nuestros pacientes fuese similar al de las regiones geográficas vecinas (sur de Europa).

Estos tumores relacionados con el HPV presentan unas características clínicas y pronósticas diferentes a aquellos no relacionados con el HPV, pero no se ha demostrado en todas las localizaciones de cabeza y cuello, ni en todas las áreas geográficas.



## **B. Objetivos:**

- 1-** Determinar la presencia de infección activa por el HPV en carcinomas de orofaringe, laringe e hipofaringe tratados en el Hospital Universitario Central de Asturias, para conocer si existe una relación etiológica de dichos tumores con la infección por el HPV.
  
- 2-** Comparar las características clínicas y evolución de los tumores en función de la presencia de infección por el HPV a fin de determinar el significado pronóstico de dicha infección.



## **3. MATERIAL Y MÉTODOS**



## I. Pacientes

Recolectamos muestras tisulares de 372 pacientes con el diagnóstico de carcinoma epidermoide primario tratados quirúrgicamente en el Hospital universitario Central de Asturias entre 1990 y 2009. De ellos, 62 casos (17%) correspondían a tumores de laringe, 62 (17%) a tumores de hipofaringe (muestras recogidas para ambas localizaciones entre 2002 y 2007) y 248 (66%) a tumores de orofaringe (muestras recogidas entre 1990 y 2009). En todos los casos se había obtenido consentimiento de los pacientes y la recogida de las mismas se hizo siguiendo las recomendaciones del comité de ética del hospital. Dado que han sido los tumores de orofaringe los que específicamente se han relacionado con el HPV en otros estudios, en este vamos a analizar por separado los tumores de localización orofaríngea y los de no-orofaríngea.

### *a) Carcinomas de orofaringe*

Se recolectaron muestras tisulares de 248 pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide de orofaringe procedentes de exéresis quirúrgica llevada a cabo en el Hospital Universitario Central de Asturias entre los años 1990 y 2009. De ellos, 140 casos correspondían a tumores de amígdala y 108 a tumores de base de lengua. Las características clínico-patológicas se muestran en la **tabla 1**.

**Tabla1:** Características clínico-patológicas de los pacientes incluidos

		Orofaringe	No Orofaringe
Número Total		248	124
Edad (años)		58 (30-85)	60
Género	Hombre Mujer	239 (96%) 9 (4%)	119 (96%) 5 (4%)
Localización	A B	130 Amígdala (52%) 108 Base Lengua (48%)	62 Laringe (50%) 62 Hipofaringe (50%)
Tabaco	No 1-50 paq-año >50 paq-año Desconocido	7 (3%) 131 (53%) 105 (42%) 5 (2%)	5 (4%) 71 (57%) 48 (39%) 0
Alcohol	No <50 gr/día 51-100 gr/día >100 gr/día Desconocido	9 (3%) 17 (7%) 62 (25%) 155 (63%) 5 (2%)	17 (14%) 26 (21%) 36 (29%) 45 (36%) 0
Estadio	I II III IV	6 (2%) 21 (8%) 41 (17%) 180 (73%)	12 (10%) 3 (2%) 23 (19%) 86 (69%)
T	1 2 3 4	18 (7%) 60 (25%) 82 (33%) 88 (35%)	17 (14%) 18 (15%) 44 (35%) 45 (36%)
N	0 1-3	62 (25%) 186 (75%)	40 (32%) 84 (68%)
Grado	Bien Moderadamente Pobremente Desconocido	113 (46%) 90 (36%) 44 (18%) 1 (0%)	34 (27%) 55 (45%) 35 (28%) 0
Radioterapia	No Sí	82 (33%) 166 (67%)	58 (47%) 66 (53%)
Recurrencia	No Local Regional Metástasis a distancia Local+ Regional Local + regional + metástasis	99 (40%) 47 (19%) 19 (8%) 38 (15%) 31 (13%) 14 (5%)	47 (38%) 9 (7%) 12 (10%) 30 (24%) 6 (5%) 20 (16%)
Segundo Primario	No Sí	212 (86%) 28 (14%)	112 (90%) 12 (10%)
Curso Clínico	Vivo sin tumor Muerto por la enfermedad Muerto otra causa Pérdida de seguimiento	54 (22%) 131 (53%) 47 (19%) 8 (3%)	34 (27%) 72 (58%) 15 (12%) 3 (3%)

Todos los pacientes presentaban un tumor primario único y no habían recibido ningún tratamiento previo a la cirugía. Solamente 9 pacientes eran mujeres, y la edad media al diagnóstico era de 58 años (rango de 30 a 85 años). Todos los pacientes salvo 7 eran fumadores, de ellos 131 eran fumadores moderados (1-50 paquetes-año), y 105 grandes fumadores (>50 paquetes-año).

El estadio del tumor fue determinado de acuerdo al sistema TNM de la UICC (7ª Edición): 6 tumores correspondían a Estadio I, 21 a Estadio II, 41 a Estadio III, 153 a Estadio IVA y 27 a Estadio IVb. Ningún paciente presentaba metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. El 67% (166) de los pacientes recibieron radioterapia postoperatoria. El grado de diferenciación de los tumores estudiados correspondía a 113 bien diferenciados, 90 moderadamente diferenciados y 44 pobremente diferenciados según la clasificación de Broders (un caso no fue clasificado).

#### *b) Carcinomas de laringe-hipofaringe*

Igualmente recolectamos muestras de 62 casos de carcinomas epidermoides de laringe y 62 casos de hipofaringe con las características de extensión tumoral (T), presencia de ganglios linfáticos afectados (N), grado de diferenciación (G) y estadio según se recogen en la **tabla 1**.

Todas las muestras analizadas habían sido obtenidas a partir de material procedente de la exéresis quirúrgica del tumor, siendo la técnica de exéresis utilizada (laringectomía total o parcial) y el tratamiento complementario a la cirugía administrado (RT) el indicado a la extensión que presentaba el tumor en el momento del diagnóstico. Del total, 66 pacientes (53%) recibieron RT complementaria.

Todos los pacientes tenían un único tumor primario y no habían recibido tratamiento previo a la cirugía. De toda la serie, solo 5 pacientes eran mujeres, y la media de edad fue de 60 años. Todos los pacientes excepto 5 eran fumadores (N=119; 96%) de los cuales 71 eran fumadores moderados (1-50 paquetes-año) y 48 eran grandes fumadores (>50 paquetes-año). Además 107 pacientes eran bebedores habituales.

El estadio de los tumores fue determinado de acuerdo a la clasificación TNM de la UICC (7ª edición): 12 tumores correspondían a Estadio I, 3 a Estadio II, 23 a estadio III y 86 a estadio IV. Ninguno de ellos presentaba metástasis a distancia en el momento del diagnóstico. El grado de diferenciación de los tumores estudiados correspondía a 34 bien diferenciados, 55 moderadamente diferenciados y 35 pobremente diferenciados según la clasificación de Broders.

## **II. Construcción de Matrices tisulares**

Las muestras fueron revisadas por un patólogo, que seleccionó las áreas más representativas de cada tumor, de las que se obtuvieron 3 cilindros de 1 mm de diámetro de cada caso para construir 14 matrices tisulares que contenían todos los casos. Además de las muestras tumorales, en cada matriz se incluyó mucosa faríngea normal como control negativo y muestras de carcinoma de cérvix HPV-positivo como control positivo. Las matrices tisulares fueron construidas por el personal del Banco de Tumores del HUCA-IUOPA.

## **III. Inmunotinción de p53 y p16**

Las matrices tisulares fueron cortadas en secciones de 4 micrómetros y pegadas en un portaobjetos siliconizado (Dako). Las secciones fueron desparafinizadas en xileno y rehidratadas con un gradiente de alcoholes. La recuperación del antígeno fue llevada a cabo usando un tampón de citrato y calentando la preparación durante 5 minutos.

La tinción se realizó a temperatura ambiente en un Dispositivo Automático de Tinción (Dako Autostainer), usando el Envision peroxidase mouse system (Envision Plus, Dako). Los portaobjetos fueron colocados en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% durante 20 minutos y luego se les dejó reaccionar con un anticuerpo monoclonal IgG anti p53 (clon DO-7, Dako) en dilución 1:50 durante 30 minutos, o con el anticuerpo monoclonal IgG anti-p16 (CINtek, Roche Diagnostics) en dilución 1:100 durante 30 minutos.

La Inmunodetección se llevó a cabo por medio del sistema Envision Plus, utilizando diaminobenzidina (DAB) como sustrato cromógeno (Dako). El paso final fue la contratinción con hematoxilina durante 1 min.

Después de la tinción, los portaobjetos fueron deshidratados nuevamente a través de un gradiente de alcoholes y se finalizó la preparación colocando un cubreobjetos utilizando un medio estándar.

Para p53 se utilizó como control positivo una muestra de adenocarcinoma de colon que se sabía que expresaba p53. Para p16 se empleó como control positivo una muestra de carcinoma de cérvix uterino. Como control negativo se incluyó una muestra de la preparación no expuesta al antisuero.

Las preparaciones fueron observadas al azar, por dos investigadores, sin conocer datos clínicos de las muestras que observaban. En el caso de p53 la puntuación de tinción asignada fue dada en base al porcentaje de células con tinción nuclear (0-100%), considerándose positivos los casos con más del 10% de las células teñidas. En el caso de p16 se consideró tanto la tinción nuclear como la citoplasmática, considerándose negativos (0) los casos sin tinción, tinción débil (1+) los casos con tinción nuclear o citoplasmática débil o en menos del 75% de las células, y tinción fuerte (2+) los casos con tinción intensa y difusa (>75% de las células) nuclear y citoplasmática. Cada investigador asignó una puntuación de tinción y los casos discordantes fueron puntuados por consenso. El grado de discordancia fue menor del 5%.

#### **IV. Extracción del ADN tumoral**

Se obtuvieron además otros dos cilindros de 2 mm de cada muestra tumoral para llevar a cabo el aislamiento del ADN tumoral, usando un punch estéril desechable para cada caso evitando así la contaminación cruzada. Se tuvo especial cuidado al tratarse de ADN procedente de muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina, ya que este puede estar parcialmente degradado y entrecruzado. Aplicamos un elaborado protocolo especialmente

diseñado para muestras embebidas en parafina<sup>(109,126-127)</sup>, que consistía en desparafinización en Xileno, lavados con metanol para eliminar cualquier resto de Xileno e incubación durante 24 horas en una solución 1 mol/L de isocianato de sodio para reducir los cruzamientos. A continuación las muestras fueron digeridas durante 3 días con altas dosis de proteinasa K (2 µg/µL añadidos diariamente). Finalmente la extracción del ADN fue llevada a cabo usando el GIAamp DNA mini Kit (Qiagen GmbH), siguiendo las instrucciones del fabricante. La calidad del ADN así extraído se comprobó mediante la amplificación por PCR del gen de la β-globina.

## **V. Detección del ADN de HPV y Genotipado por GP5+/6+-PCR-EIA y ensayo Luminex**

El ADN de HPV de alto riesgo fue aislado según se ha descrito en trabajos previos<sup>(109,126)</sup>. El ADN aislado fue sometido a PCR con los cebadores degenerados de consenso GP5+/6+, que amplifican la región conservada del gen L1 de forma que detectan la amplia mayoría de los serotipos de HPV.

Posteriormente se sometió a enzimo-inmuno-análisis (EIA) para detectar 14 tipos de HPV de alto riesgo (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66 y 68). El genotipado de los casos positivos en el EIA se llevó a cabo por hibridación, empleando la plataforma Luminex. Los casos positivos al realizar la PCR con los cebadores GP5+/6+, fueron sometidos para confirmación adicional a una PCR específica para HPV 16 usando cebadores localizados en el gen E7 (fw: GAGGAGGAGGATGAAATAGATGGT, y re: TTGTACGCACAACCGAAGC). En todos los experimentos se realizaron en paralelo reacciones sin añadir muestra alguna para descartar contaminación.

## **VI. Detección de ARNm del gen E6 del HPV-16**

Los casos positivos en EIA fueron sometidos a la detección del ARNm del HPV-16 como ha sido descrito previamente<sup>(109)</sup>. Brevemente, tras la extracción de ARNm del tumor, se realizó la amplificación mediante RT-PCR de la variante más común de ensamblado del ARNm del gen E6, empleando los cebadores fw: TTAAGTGGACGTGAGGTGTA y re: GGAATCTTTGCTTTTGTCC5.

## **VII. Detección de ADN del HPV mediante hibridación “in situ”:**

Para una mayor seguridad en la detección del ADN viral se llevó a cabo también una hibridación “in situ” con sondas de ADN de HPV biotinilado que reaccionaba con los tipos de HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 y 68 (kit Y1443, Dako,) en secciones de tejido fijados con formalina e incluidos en parafina.

Secciones de tejido de 4 micrómetros fueron desparafinizadas en xileno, rehidratadas con alcohol y secadas al aire. Las secciones fueron luego tratadas con proteinasa K para que las muestras de ADN fueran accesibles a las sondas biotiniladas, y posteriormente fueron nuevamente deshidratadas mediante un gradiente de alcoholes. A continuación las sondas de ADN fueron añadidas a la preparación y se colocó un cubre-objetos.

Las sondas y el ADN diana fueron desnaturalizados colocando los portaobjetos en una superficie calentadora plana a 92°C durante 5 minutos. Tras la desnaturalización, los portaobjetos fueron colocados en una cámara húmeda pre-calentada a 37°C durante 16 horas para que se produjese la hibridación. La detección de la sonda hibridada, se llevó a cabo usando el GenPoint Detection System (K0620, Dako) siguiendo las instrucciones proporcionadas con el kit.

Como control positivo se emplearon muestras de carcinoma de cérvix uterino positivas para el HPV-16. Los resultados fueron evaluados por dos observadores independientes. La tinción focal con Diaminobenzidina en el núcleo de las células tumorales se consideró HPV positivo.

### **VIII. Análisis estadístico**

Todas las comparaciones llevadas a cabo se realizaron utilizando el test estadístico Chi cuadrado de Pearson y la estimación de la supervivencia se llevó a cabo mediante el método de Kaplan-Meier. Las diferencias entre supervivencias se analizaron con el método de rangos logarítmicos. Un valor de p inferior a 0,05 es considerado como estadísticamente significativo. Todos los datos fueron analizados con la ayuda del software estadístico SPSS 19.0.



## **4. RESULTADOS**

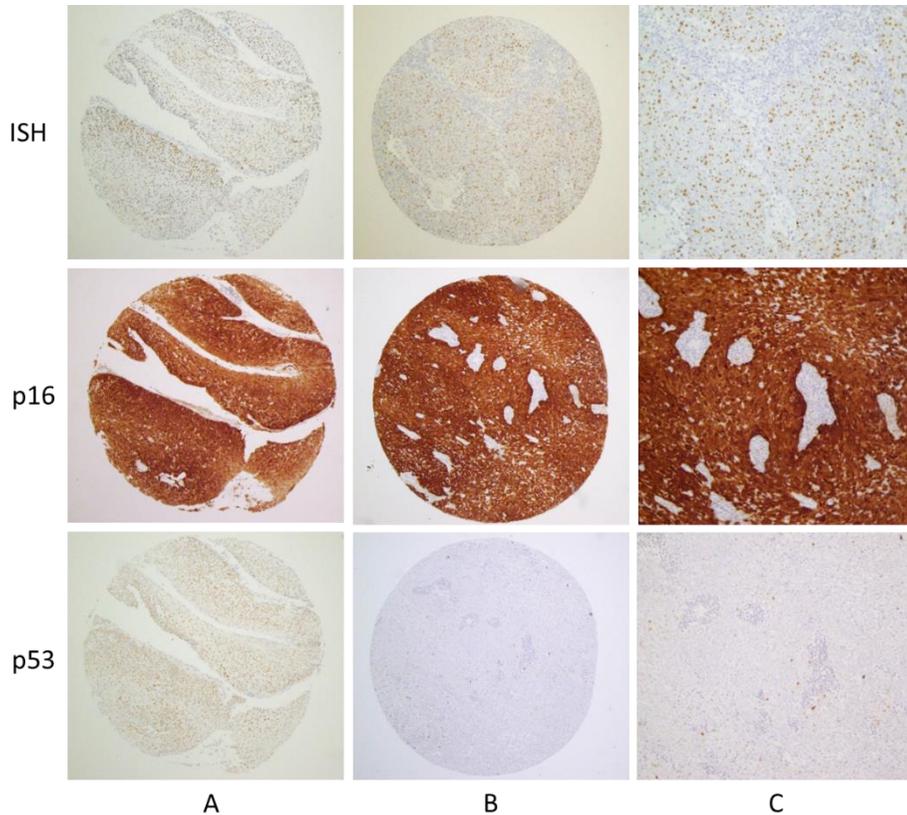


## I. Carcinomas de la Orofaringe:

Treinta (12%) de los 248 casos estudiados mostraron expresión de p16: 15 presentaban una tinción débil (1+) y 15 una tinción fuerte (2+) (**Figura 9**). La expresión positiva de p53 fue hallada en 145 de 246 casos evaluables (58%) (**Figura 9**). Once casos (4%), presentaron una tinción fuerte (2+) para p16 y negatividad para p53, que es el perfil inmunohistoquímico asociado a la infección activa por el HPV.

Siguiendo el protocolo de Smeets et al<sup>(109)</sup>, la detección del ADN del HPV por PCR con GP5+/6+ fue llevada a cabo en los 30 casos que presentaron inmunotinción positiva para p16 (tanto 1+ como 2+), y se obtuvieron 8 casos positivos. De ellos, seis estaban localizados en la amígdala y los otros dos en base de lengua. Todos los casos positivos contenían ADN del HPV tipo 16 y presentaban inmunotinción positiva fuerte (2+) para p16 y eran negativos para p53. Todos los casos positivos fueron confirmados mediante la determinación por RT-PCR del ARNm del gen E6 del HPV-16.

Adicionalmente, se realizó hibridación “in situ” (ISH) para detectar el ADN de HPV en los 248 casos, siete de los cuales fueron positivos, coincidiendo con los positivos por PCR, mientras que uno de los casos positivos por PCR fue negativo por ISH.



**Figura 9:**

**A:** Carcinoma de cérvix uterino HPV-positivo: p16 2+, p53-, ISH+ (100x)

**B:** Carcinoma de orofaringe HPV-positivo: p16 2+, p53-, ISH+(100x) / **C:** ídem (200x)

Las características detalladas de los casos HPV-positivos se muestran en la **tabla 2**.

Histológicamente, siete de los casos positivos por PCR presentaban un patrón de diferenciación basaloide (**Figura 9C**).

**Tabla 2:** Resultado de genotipado de HPV; HPV ISH; IHQ de p16 y p53, y examen histológico de los casos HPV G5+/6+-PCR positivos.

	Localización	GP5+/6+-PCR	ISH	IHQ		Histología
	A / B	Tipo HPV		P16	P53	
<b>1</b>	A	16	pos	2+	0	B
<b>2</b>	A	16	pos	2+	0	B
<b>3</b>	A	16	pos	2+	0	B
<b>4</b>	A	16	pos	2+	0	B
<b>5</b>	A	16	Neg	2+	0	B/Q
<b>6</b>	A	16	pos	2+	0	B
<b>7</b>	B	16	pos	2+	0	B
<b>8</b>	B	16	pos	2+	0	Q

Legenda: A/B: Amígdala/Base de lengua; ISH: Hibridación in situ; IHQ:Inmunohistoquímica; B: diferenciación basaloide; Q: diferenciación queratinizante;

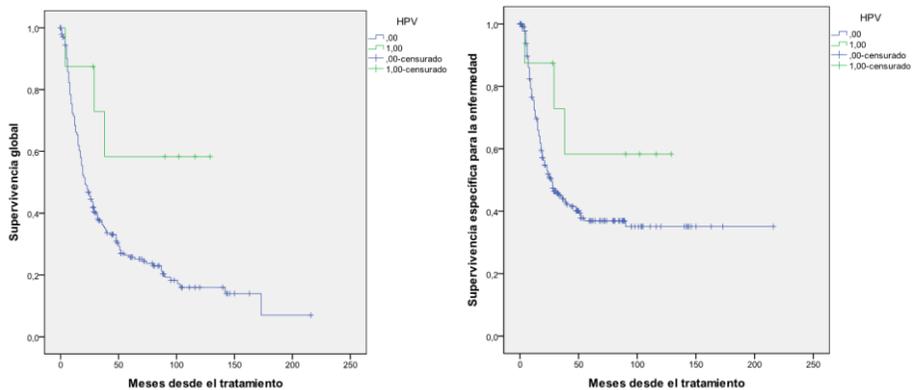
La relación entre el estatus GP5+/GP6+-PCR del ADN del HPV y las características clínico-patológicas de los tumores se recogen en la **tabla 3**. Todos los pacientes HPV-positivos eran hombres, y predominaban los tumores de amígdala. Aunque la edad media de los casos HPV-positivos era ligeramente inferior, las diferencias no fueron significativas. La presencia del HPV se correlacionaba inversamente con el consumo de alcohol y tabaco ( $p < 0,001$ ). Tres de 8 (37,5%) casos HPV-positivo eran tumores en estadios tempranos (I, II), mientras que entre los HPV negativos, solo 24 casos de 240 (10%) correspondían a dichos estadios ( $p = 0,045$ ) No se hallaron diferencias significativas en cuanto a la clasificación T, afectación de ganglios linfáticos o grado de diferenciación.

**Tabla 3.** Características clínico-patológicas de los casos HPV-positivos

		HPV neg	HPV pos	P	Estadístico
<b>Número Total</b>		240	8		
<b>Edad (años)</b>		58 (30-85)	56 (38-80)	0,326	T test
<b>Género</b>	Hombre	231	8	1,000	Fisher
	Mujer	9	0		
<b>Localización</b>	Amígdala	134	6	0,472	Fisher
	Base de Lengua	106	2		
<b>Tabaco</b>	No	5	2	<0,001	Pearson
	1-50 paq-año	125	6		
	>50 paq-año	105	0		
	Desconocido	5	0		
<b>Alcohol</b>	No	6	3	<0,001	Pearson
	<50 gr/día	15	2		
	51-100 gr/día	59	3		
	>100 gr/día	155	0		
	Desconocido	5	0		
<b>Estadio</b>	I	5	1	0,121 0,045	Pearson Fisher (I+II Vs III+IVa+IVb)
	II	19	2		
	III	40	1		
	IVa	149	4		
	IVb	27	0		
<b>T</b>	1	17	1	0,407 0,113	Pearson Fisher (T1+2 Vs T3+4a+4b)
	2	56	4		
	3	80	2		
	4a	84	1		
	4b	3	0		
<b>N</b>	0	59	3	0,416	Fisher
	1-3	181	5		
<b>Grado</b>	Bien	109	4	0,209	Pearson
	Moderadamente	89	1		
	Pobrememente	41	3		
	Desconocido	1	0		
<b>Radioterapia</b>	No	78	4		
	Sí	162	4		
<b>Recurrencia</b>	No	95	4	0,717	Fisher (No Vs Si)
	Local	47	0		
	Regional	18	1		
	Metástasis a dist.	37	1		
	Local+ Regional	29	2		
	Local + regiona l + metástasis.	14	0		
<b>Segundo Primario</b>	No	212	8	0,603	Fisher
	Sí	28	0		
<b>Curso Clínico</b>	Vivo sin tumor	54	5	0,175	Mantel- Cox
	Muerto por enfermedad	131	3		
	Muerto otras causas	47	0		
	Pérdida de seguimiento	8	0		

En cuanto al curso clínico de la enfermedad, aunque el porcentaje de recidivas en los pacientes HPV-positivos fue menor (4/8, 50%) que en los HPV-negativos (145/240, 61%), las diferencias no fueron significativas ( $p=0,717$ ).

De forma similar, la supervivencia específica para enfermedad fue mejor en el grupo HPV positivo, a pesar de que no se alcanza significación estadística debido al bajo número de casos HPV positivos ( $p=0,175$ ; **Figura 10**). Sin embargo la supervivencia global sí fue significativamente mejor en los casos HPV-positivos ( $p=0,031$ ; **Figura 10**). Esto puede ser debido a que ninguno de los pacientes con tumores HPV positivos desarrollaron un segundo tumor primario.



**Figura 10:** Supervivencia global (izquierda) y específica (derecha) de los tumores HPV-positivos (1) y HPV-negativos (0)

Para analizar posibles tendencias temporales en cuanto a la incidencia del HPV en nuestros casos, los pacientes se categorizaron en dos grupos de acuerdo al momento de diagnóstico: 166 pacientes diagnosticados entre 1990-1999 y 82 pacientes entre 2000-2009. La proporción de casos HPV positivos mostró un incremento desde un 1,8% a un 6,1%, mientras que el porcentaje de grandes fumadores descendió desde un 49% a un 29%. El consumo importante de alcohol permaneció estable en un 60-64% y la proporción de tumores de amígdala cayó de un 63% a un 44% (**Tabla 4**). El resto de parámetros evaluados no mostró ninguna tendencia temporal (edad al diagnóstico, clasificación-T, clasificación-N, recurrencia, y desarrollo de segundo primario).

**Tabla 4:** Distribución de tumores HPV-positivos, grandes fumadores y bebedores y localización en amígdala en las dos décadas: 1990-1999 y 2000-2009.

	<b>1990-1999</b>	<b>2000-2009</b>	<b>P</b>	<b>Estadístico</b>
	N = 166	N = 82		
<b>HPV positivo</b>	3 (1.8%)	5 (6.1%)	0.120	Fisher
<b>Tabaco &gt; 50 paq-año</b>	81 (49%)	24 (29%)	0.009	Pearson
<b>Alcohol &gt; 100gr/día</b>	106 (64%)	49 (60%)	0.991	Pearson
<b>Localización en Amígdala</b>	104 (63%)	36 (44%)	0.006	Fisher

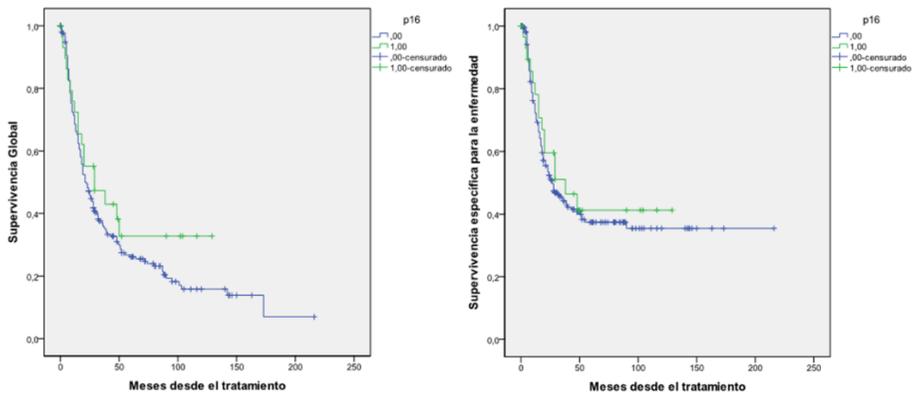
La relación entre la expresión de las proteínas p16 y p53 y las características clínico-patológicas de los tumores estudiados se muestra en la **tabla 5**.

**Tabla 5:** Características clínico-patológicas en relación a la expresión p53 y p16

Parámetro	Total casos	P16 positivo	P	Total casos *	P53 positivo	P
<b>Localización</b>						
- Amígdala	140	22 (16%)	0,05	138	80 (58%)	0,8
- Base de lengua	108	8 (7,5%)		108	65 (60%)	
<b>Clasificación T</b>						
- T1-T2	78	12 (15%)	0,51	77	51(66%)	0,28
- T3	82	10 (12%)		82	46 (56%)	
- T4	88	8 (9%)		86	46 (53%)	
<b>Clasificación N</b>						
- N0	62	6 (10%)	0,65	60	33 (55%)	0,55
- N1-3	186	24 (13%)		186	112 (60%)	
<b>Diferenciación</b>						
- Bien (G1)	113	15 (13%)	0,73	112	62 (55%)	0,34
- Moderado (G2)	90	9 (10%)		89	52 (58%)	
- Pobre (G3)	44	6 (14%)		44	30 (68%)	
<b>Estadio</b>						
- I-II	27	4 (15%)	0,74	26	16 (61%)	0,9
- III	41	6 (15%)		41	23 (56%)	
- IV	180	20 (11%)		179	106 (59%)	
<b>Recidiva#</b>						
- No	99	13 (13%)	0,69	98	66 (67%)	0,03
- Si	149	17 (11%)		148	79 (53%)	

# Agrupando cualquier tipo de recidiva // \* 246 casos evaluables

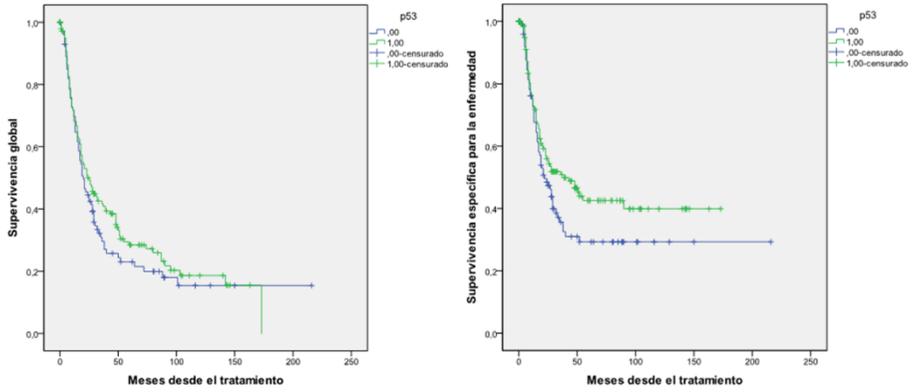
Las únicas asociaciones que se encontraron fueron la expresión de p16 con la localización amigdalina y la de p53 con menor recurrencia tumoral. En cuanto a la relación de la expresión de p16 con el curso de la enfermedad, observamos que los casos p16 positivos presentan una ligera mejor supervivencia específica y global que los p16 negativos, aunque sin diferencias significativas ( $p=0,56$  y  $p=0,24$  respectivamente; **Figura 11**).



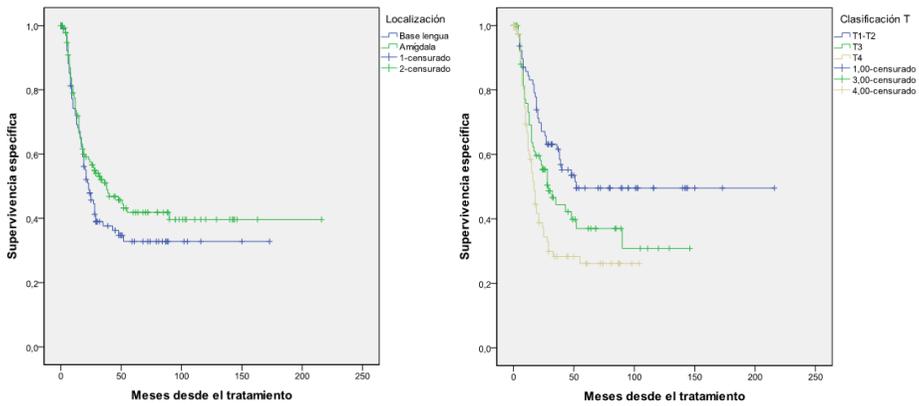
**Figura 11:** Supervivencia global (izquierda) y específica (derecha) de tumores p16 positivos (1) y p16 negativos (0)

Y respecto a la influencia de la expresión de p53 en el pronóstico, los casos con expresión positiva de p53 mostraban una mayor supervivencia específica y global, concordante con la asociación con un menor número de recidivas, pero tampoco las diferencias alcanzaron la significación estadística ( $p=0,08$  y  $p=0,31$  respectivamente; **Figura 12**).

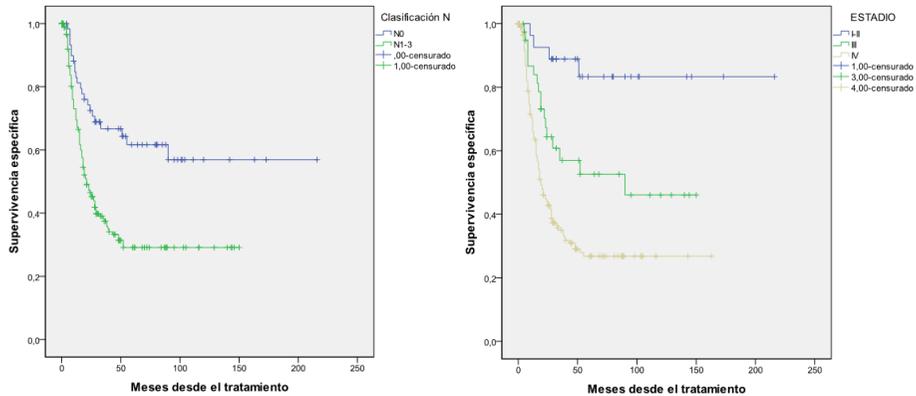
Los parámetros clínico patológicos que se asociaron con una menor supervivencia específica fueron la localización en base de lengua (aunque no significativo,  $p=0,16$ ), el tamaño tumoral avanzado ( $p=0,001$ ), la presencia de metástasis ganglionares ( $p<0,001$ ), y el estadio tumoral avanzado ( $p<0,001$ )(**Figuras 13 y 14**).



**Figura 12:** Supervivencia global (izquierda) y específica (derecha) de tumores p53 positivos (1) y p53 negativos (0)



**Figura 13:** Supervivencia específica según localización (izquierda) y tamaño tumoral (derecha)



**Figura 14:** Supervivencia específica en relación con metástasis ganglionares (izquierda) y estadio (derecha)

## II. Carcinomas de Laringe e Hipofaringe:

De los 124 casos estudiados de estas localizaciones, 17 tumores (14%) mostraron positividad para p16 en el análisis inmunohistoquímico: 9 con una tinción débil (p16 1+), que correspondían a 7 tumores de laringe y 2 de hipofaringe, y 8 con una tinción fuerte (p16 2+), 7 de laringe y 1 de hipofaringe. 73 de los 119 casos evaluables (61%) mostraban una tinción nuclear de la proteína p53 en más del 10% de las células de la muestra. Tres casos (2,5%) presentaban tinción p16 positivo 2+ y p53 negativo (patrón típico asociado al HPV). En todos los casos se realizó análisis mediante ISH y en ningún caso se detectó el ADN del HPV (**Tabla 6**).

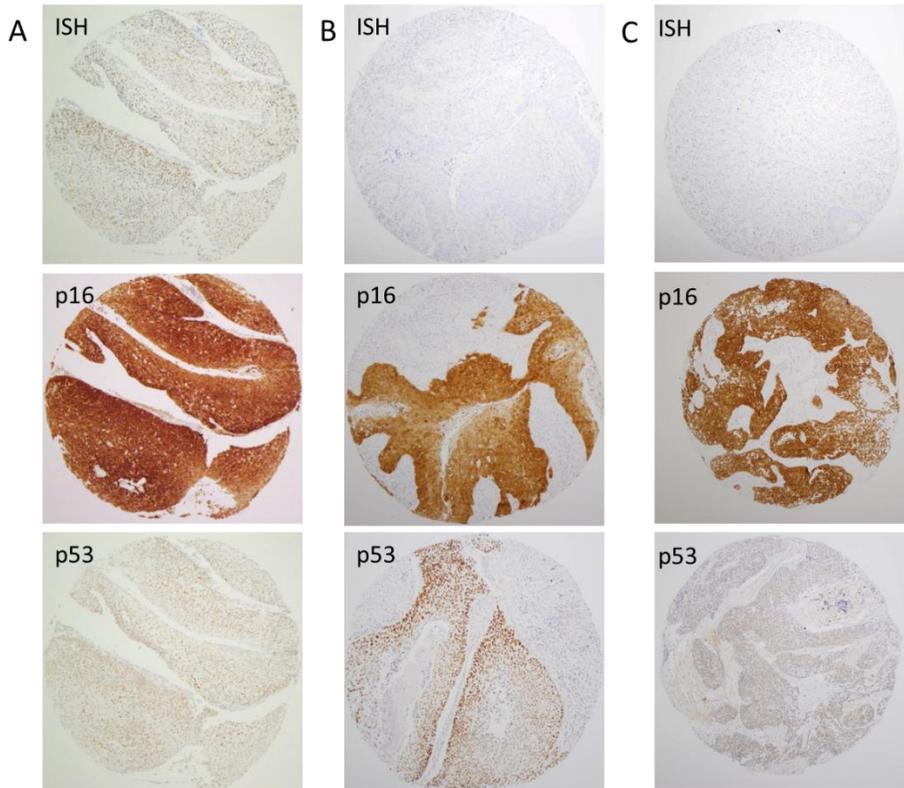
**Tabla 6:** Resultados de inmunohistoquímica e hibridación “in situ”

	Expresión P53 (*)		Expresión P16		Detección ADN viral ISH	
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
<b>Nº Casos</b>	46	73	107	17	124	0
<b>%</b>	39	61	86	14	100	0

(\*) Solo se obtuvieron datos de 119 casos

En los casos p16 positivos se realizó la detección del ADN del HPV por PCR GP5+/GP6+. En 2 de ellos, que presentaban tinción fuerte (p16 2+), se detectó el ADN del HPV (1,6% del total de la serie). Ambos contenían HPV tipo 16 tras el genotipado, y fueron positivos para la detección del ARNm del gen E6 del HPV-16 mediante RT-PCR .

Los casos HPV-positivos correspondían a dos pacientes varones. Uno de 85 años, fumador de 90 paquetes-año, con un tumor de laringe pT3N0 bien diferenciado p53 positivo, el cual no presentó recidiva tumoral falleciendo por otra causa a los 4 años. Y el otro de 80 años, fumador de 50 paquetes-año, con un tumor de hipofaringe pT3N3 pobremente diferenciado p53 negativo, el cual presentó una recidiva tumoral precoz falleciendo a los 6 meses. Las características de tinción de dichos tumores se muestran en la **figura 15**. Dado que sólo estos dos casos fueron HPV-positivos no se pudo realizar correlación con las características patológicas y evolución de la enfermedad.



**Figura 15:** Ejemplos de ISH y expresión de p16 y p53 .

**A:** carcinoma de cérvix uterino HPV-positivo (p16 2+, p53-, ISH+)

**B:** carcinoma de laringe HPV-positivo (p16 2+, p53+, ISH-)

**C:** carcinoma de hipofaringe HPV-positivo (p16 2+, p53-, ISH-)

Sí se analizó la relación entre la expresión de las proteínas p16 y p53 y las características clínico-patológicas de los tumores estudiados. Estudiamos la asociación con el tamaño tumoral (T), la presencia de metástasis ganglionares (N), el grado histológico del tumor (G), el estadio, y el desarrollo de recidiva local, regional y de metástasis. Los resultados obtenidos se muestran en la **tabla 7**.

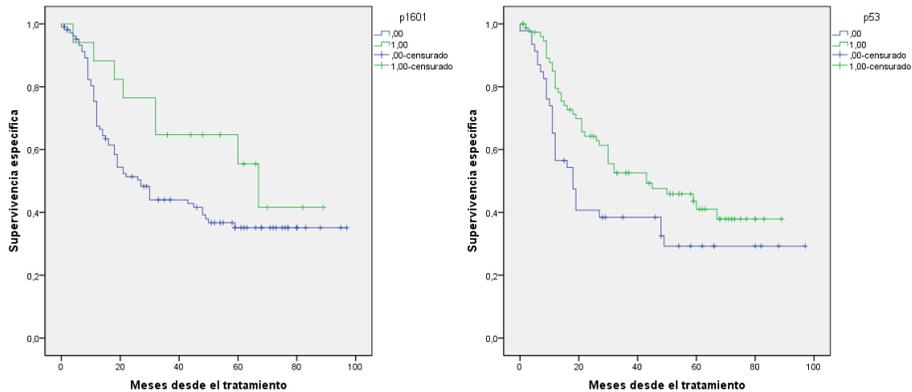
**Tabla 7:** Relación de la expresión de p16 y p53 con los parámetros clínico-patológicos en los tumores de laringe e hipofaringe

Parámetro	Total casos	P16 positivo	P	Total casos *	P53 positivo	P
<b>Localización</b>						
- Laringe	62	14 (22%)	0,007	58	37 (64%)	0,7
- Hipofaringe	62	3 (5%)		61	36 (59%)	
<b>Clasificación T</b>						
- T1	17	5 (29%)	0,077	15	7 (47%)	0,57
- T2	18	0		16	11 (69%)	
- T3	44	7 (16%)		43	28 (65%)	
- T4	45	5 (11%)		45	27 (60%)	
<b>Clasificación N</b>						
- N0	40	10 (25%)	0,023	35	24 (68%)	0,41
- N1-3	84	7 (8%)		84	49 (58%)	
<b>Diferenciación</b>						
- Bien (G1)	34	5 (15%)	0,24	31	19 (61%)	0,7
- Moderado (G2)	55	10 (18%)		54	35 (65%)	
- Pobre (G3)	35	2 (6%)		34	19 (56%)	
<b>Estadio</b>						
- I	12	4 (25%)	0,14	10	6 (60%)	0,3
- II	3	0		1	1 (100%)	
- III	23	4 (17%)		22	17 (77%)	
- IV	86	9 (10%)		86	49 (57%)	
<b>Recidiva#</b>						
- No	47	8 (17%)	0,43	42	31 (74%)	0,049
- Si	77	9 (12%)		77	42 (54%)	

\* En 5 casos no se pudo valorar la tinción adecuadamente. // # Agrupando cualquier tipo de recidiva

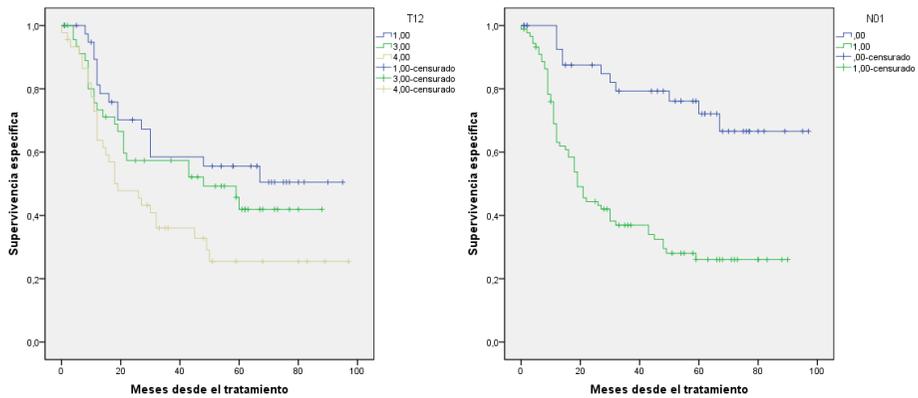
La positividad para p16 fue significativamente más frecuente en los tumores de localización laríngea ( $P=0,007$ ), y los tumores sin metástasis ganglionares ( $P=0,023$ ). En relación con p53, no se halló ninguna asociación significativa, salvo la asociación con una menor frecuencia de recidivas tumorales en los casos p53 positivos ( $P= 0,049$ ).

En cuanto al valor pronóstico de la expresión de ambas proteínas, la expresión positiva de p16 parece relacionarse con una mayor supervivencia, aunque las diferencias no alcanzan la significación estadística ( $P=0,127$ ; **Figura 16**). La presencia de p53 nuclear en  $> 10\%$  de las células se asocia con una mayor supervivencia, siendo las diferencias significativas ( $P=0,041$ ; **Figura 16**).

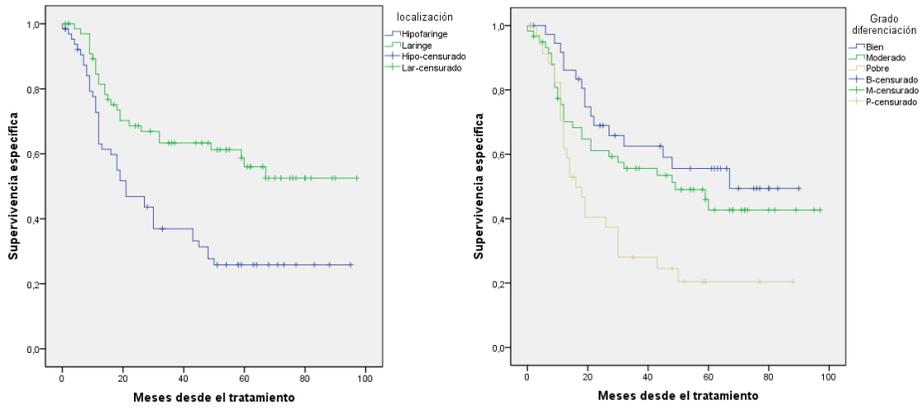


**Figura 16:** Supervivencia específica en función de la expresión de p16 (izquierda) y p53 (derecha). 0: Expresión negativa; 1: Expresión positiva.

Como es habitual en estos tumores, el parámetro que se asocia de forma más significativa con una peor supervivencia es la presencia de metástasis ganglionares ( $P < 0,000$ ; **Figura 17**). También se aprecia un peor pronóstico a medida que se avanza en la clasificación T ( $P = 0,028$ ; **Figura 17**). Los tumores localizados en la hipofaringe presentan un peor pronóstico ( $P = 0,001$ ; **Figura 18**), y los casos pobremente diferenciados también muestran una supervivencia significativamente disminuida ( $P = 0,019$ ; **Figura 18**).



**Figura 17:** Supervivencia específica en función de la clasificación T (izquierda) y N (derecha). En la clasificación T se agrupan los casos T1-T2 (1) frente a los T3 (3) y T4 (4). En la clasificación N los casos N0 (0) frente a los N1-N3 (1).



**Figura 18:** Supervivencia específica en relación con localización tumoral (izquierda) y el grado de diferenciación (derecha)

## 5. DISCUSIÓN



En las últimas dos décadas, se han publicado múltiples estudios sobre la prevalencia de infección por HPV en carcinomas epidermoides de orofaringe (OPSCC), con resultados muy variables, que van desde un 17% hasta un 93%(41,44,126,128).

Esto no es más que un reflejo de que en estas décadas, los estudios para la detección del HPV en los tumores de cabeza de cuello han sido indisciplinados y no sistemáticos, y ello ha derivado en una gran heterogeneidad de resultados en la literatura.

Establecer cuándo y por qué estudiar la implicación del HPV en un determinado tumor es el primer paso a llevar a cabo, y es algo en lo que no se ha profundizado suficientemente en muchos casos.

Ello ha llevado a que en la práctica clínica, el estudio de infección por HPV en algunos centros asistenciales no se realice nunca y en otros se realice de forma indiscriminada, sin tener en cuenta la localización anatómica, los hallazgos microscópicos de la muestras estudiadas, la relevancia clínica derivada de la positividad para dicho estudio y otros factores que influyen en la significación de la detección del virus en una determinada muestra tumoral.

#### Relevancia del estudio de HPV en los tumores de cabeza y cuello:

Los médicos clínicos no hemos sido capaces de establecer marcadores pronósticos más allá del estadio tumoral para los tumores de cabeza y cuello. Numerosos estudios han investigado el valor pronóstico del índice de proliferación celular (Ki67), p53, apoptosis, aneuploidía, sobreexpresión de EGFR y otros marcadores de actividad biológica, pero ninguno se ha mostrado como consistente a través de múltiples estudios(129-132).

El HPV se ha demostrado como un poderoso biomarcador que condiciona un mejor pronóstico, con menor riesgo de progresión y muerte, y mayor sensibilidad a radiación con o sin quimioterapia asociada en tumores de orofaringe<sup>(29,45,133)</sup>. Este valor pronóstico ha sido reconocido mediante la inclusión en la última edición del sistema de clasificación TNM (8ª Edición, diciembre 2016) de una clasificación diferenciada para los tumores de orofaringe p16 positivos (como marcador indirecto de infección por el HPV).

En la práctica clínica, además se está usando como marcador de origen orofaríngeo en grandes tumores con extensión local que invaden localizaciones anatómicas próximas y en aquellos que se presentan como metástasis linfáticas cervicales<sup>(134)</sup>.

El objetivo en el futuro es poder realizar un tratamiento más individualizado en base al estatus HPV, ya que su positividad justifica una menor dosis de quimioterápicos y/o radiaciones (desintensificación terapéutica)<sup>(135)</sup>.

## I. Infección por HPV en carcinomas de la orofaringe

A lo largo de la última década se ha recopilado gran cantidad de información sobre el papel que el HPV juega en el proceso carcinogénico de los tumores de cabeza y cuello y su implicación en el mismo a lo largo de los cinco continentes.

En cuanto a la prevalencia de infección del virus en tumores de cabeza y cuello, recogemos una serie de estudios relevantes, que merecen un análisis detallado.

**Kreimer et al**, en 2005<sup>(42)</sup> realizan una revisión sistemática de 60 estudios basados en detección y genotipado de HPV por PCR. Se incluyeron 5.046 casos de carcinoma de cabeza y cuello.

Hallaron una prevalencia total de infección en carcinomas de cabeza y cuello del 25,9% (95% IC 24,7-27,2). La prevalencia fue significativamente más alta en carcinomas de orofaringe (35,6%) que en carcinomas de cavidad oral (23,5%) o laringe (24%).

Se detecta HPV 16 en el 86,7% (95% IC 82,6-90,1) de los casos positivos en orofaringe (30,9% del total de casos de orofaringe); En carcinomas de mucosa oral en el 68,2% (95% IC 64,4-71,9) de los casos positivos (16% del total de carcinomas orales) y en carcinomas laríngeos en el 69,2% (95% IC 64,0-74,0) (16,6% del total de carcinomas de laringe).

Se detecta HPV 18 en el 1% del total de carcinomas de orofaringe (2,9% de los casos HPV positivos)/ el 8% de carcinomas de cavidad oral (34,5% de los casos HPV positivos) y el 3,9% de carcinomas de laringe (17,2% de los HPV positivos).

Detectan infecciones múltiples en un 3,6%, y en la mayoría de ellas coexistía otro tipo de HPV con el HPV tipo 16.

En el subanálisis por regiones:

- En carcinomas de orofaringe la prevalencia de infección fue significativamente más alta en Norte América (47%), que en Europa (28,2%). En Asia la prevalencia fue del 46%(N=54).
- En carcinomas orales la prevalencia fue similar en Europa (16%) y Norte América (16,1%) pero significativamente mayor en Asia (33%).
- En carcinomas de laringe la prevalencia fue de 21,3%, 13,8% y 38,2% en Europa , Norteamérica y Asia respectivamente.

De los 60 estudios recogidos, solo 5 en cavidad oral, uno en orofaringe y 3 en laringe contaban con una N superior a 100 casos. Estos estudios tendían a mostrar una prevalencia de HPV inferior a la media. Los autores recogen un posible sesgo de selección de casos en algunos de los estudios incluidos en el análisis.

La explicación biológica de por qué el HPV tiene preferencia por la orofaringe no está clara. La similitud entre la yuxtaposición de epitelio escamoso y tejido linfático existente en las amígdalas, parece tener propiedades similares a la unión escamoso-columnar del cuello uterino donde se originan la mayoría de tumores HPV-asociados del tracto genital femenino a pesar de la ubicuidad del virus en la vagina y vulva de las mujeres sexualmente activas.

**Mehanna et al**, en 2013<sup>(46)</sup>, realizan un meta-análisis sobre las últimas dos décadas, que recoge la prevalencia a nivel mundial, por continentes, y realizando un análisis de tendencia temporal, contraponiendo los carcinomas de orofaringe al resto de tumores de cabeza y cuello.

Incluyen 269 estudios, con un total de 19368 pacientes.

Estiman una prevalencia mundial de infección por HPV en carcinomas epidermoides de orofaringe en las últimas dos décadas de un 47,7%, pasando de un 40,5% antes del año 2000, a un 64,3% entre 2000 y 2004 y a un 72,2% a partir de 2005.

Lo más interesante es que en el análisis por regiones, se observa un ritmo de incremento en la detección de HPV mucho mayor en Europa, donde las cifras se han doblado (35,3% / 59% / 73,1% respectivamente en cada periodo), que en Norteamérica (50,7% / 67,6% / 69,7%).

En cuanto al resto de tumores de cabeza y cuello no orofaríngeos las cifras permanecen mucho más estables:

- La prevalencia mundial hallada en las últimas 2 décadas es de un 21,8% (22,2% antes del 2000/ 17,2% entre 2000 y 2004 y 6,1% a partir de 2005).
- Por regiones, la evolución en Norteamérica ha sido hacia cifras de detección menores (14,1% antes del 2000 y 9,8% entre 2000 y 2004 respectivamente) y manteniéndose estables y sensiblemente más altas en Europa (23,6% antes del 2000/ 23,2% entre 2000 y 2004), con una caída al 11,7% a partir de 2005.

Para tumores orofaríngeos HPV positivos, recogen una proporción de HPV tipo 16 del 95,7%. Para los tumores no orofaríngeos el HPV tipo 16 estaba presente en el 73,9% de los casos HPV positivos.

Analizaron la prevalencia de HPV en función del método de detección del ADN de HPV:

- PCR en 78 estudios (3347 casos) = prevalencia de HPV del 44%.

- ISH en 17 estudios (1254 casos) = prevalencia de HPV del 58,8%.
- Al ajustar por el periodo en el que se realizó la prueba no se hallan diferencias significativas.

También quisieron analizar el posible sesgo producido por la mejora en la sensibilidad de las técnicas llevadas a cabo a la hora de detectar el ADN del virus comparando la prevalencia hallada por los estudios previos al 2005 (37,1%) con la hallada por los estudios posteriores a esta fecha (44,7%), sin hallar diferencias significativas.

Observaron, que los estudios que utilizaban muestras procedentes de tejido fresco congelado no mostraron diferencias en la prevalencia hallada, respecto de aquellos que utilizaban muestras embebidas en parafina y fijadas con formalina.

También clasificaron los estudios basados en PCR en función de la sensibilidad de la PCR y de los cebadores utilizados en los distintos estudios y no hallaron diferencias significativas en la prevalencia hallada por los estudios basados en una PCR clasificada como de sensibilidad baja o media (52,7%) frente a los que utilizaban una PCR con una sensibilidad alta o muy alta (39,4%).

Para estos autores el incremento en las cifras de detección de HPV en Europa ha sido real, y no lo consideran secundario a un aumento en la sensibilidad de las técnicas para detectar el virus y por tanto actualmente la diferencia entre Europa y Norte América no existe.

No consideran, dada la tendencia temporal que muestran los estudios, que estemos viviendo una fase de latencia en la implicación del HPV en los tumores no orofaríngeos, sino que el virus tiene una especial predilección por esta localización.

La conclusión a la que llegan estos autores es que los pacientes con estos tumores son más jóvenes, tienen mejor pronóstico y tasas de supervivencia mayores, por lo que supondrán un mayor coste a los sistemas de salud, que deberán darles soporte durante mucho más tiempo. Para estos autores sería aconsejable establecer algún programa de cribado eficaz y coste-efectivo, y la elevada tasa de detección del virus podría justificar la vacunación en varones.

**Ndiaye et al**, en 2014<sup>(136)</sup>, publican un nuevo metaanálisis incluyendo 148 estudios de 44 países, sumando 12.163 casos de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, estimando una prevalencia global de infección por HPV de un 45,8% en tumores de orofaringe, un 22,1% en tumores de laringe e hipofaringe y de un 24,2% en tumores de cavidad oral.

Cuando los estudios se restringen a aquellos que estudian la existencia de una infección oncológicamente activa por HPV 16 en carcinomas de orofaringe, la prevalencia se reduce a un 39,8% cuando se estudia la expresión de ARNm de E6/E7 y a un 39,7% si se estudia la sobreexpresión de p16.

Por regiones, la prevalencia de infección por HPV tipo 16 en tumores de orofaringe es mayor en Norte América (54,7%), que en Europa (36,2%). En Asia se recoge un 45,1% y en Oceanía un 42,1%. En América Central y Sudamérica se recoge una prevalencia sensiblemente más baja, de un 14,9%.

Un dato muy interesante que se recoge en este nuevo análisis es la gran heterogeneidad existente entre los diferentes estudios Europeos, atendiendo a criterios geográficos. Se diferencian subregiones Europeas, con una prevalencia de HPV 16 muy diferente siendo de un 51,1% en el Norte, 32,6% para Europa Central y del Este, 32,5% para Europa Occidental y 21,9% en el sur de Europa donde se recoge una menor prevalencia.

En este contexto epidemiológico nos propusimos estudiar el papel del HPV en los carcinomas epidermoides de orofaringe, laringe e hipofaringe en nuestro medio.

En nuestro estudio hemos utilizado el protocolo de Smeets et al<sup>(109)</sup>, método basado en la combinación de tinción inmunohistoquímica de p16 seguido de amplificación por PCR del ADN del HPV con cebadores GP5+/GP6+ en los casos p16 positivos, que ha sido validada comparando los resultados con RT-PCR de E6/E7 tanto en muestras congeladas como fijadas en formalina e incluidas en parafina, mostrando una concordancia del 98%<sup>(126)</sup>. Asimismo completamos el estudio realizando un estudio de tinción IHQ de p53, e ISH de ADN en todas las muestras. En los casos positivos por PCR de ADN de HPV, realizamos una PCR de ARNm de E6 para confirmar la actividad transcripcional del virus.

El presente estudio evaluó todos los parámetros expuestos en los algoritmos previamente mencionados y detectó un total de un 3,2% de casos positivos para HPV por GP5+/6+ PCR en una serie de 248 casos de carcinoma epidermoide de orofaringe diagnosticados entre los años 1990 y 2009 en Asturias.

Comparando las dos décadas se aprecia un incremento en la positividad para HPV desde un 1,8% a un 6,1% que supone una tasa de detección superior al triple en tan solo una década, y que está en concordancia con los estudios epidemiológicos de tendencia temporal llevados a cabo en metaanálisis<sup>(42,46)</sup>. Asimismo en series individuales, incluso con tasas de detección proporcional mucho mayores a la que nosotros hallamos, el incremento es muy similar: un estudio en Holanda<sup>(126)</sup> que utiliza el mismo protocolo de detección que nosotros, detecta un incremento desde un 5,1% a un 29% entre 1990 y 2010, y un estudio en Australia<sup>(158)</sup> un incremento desde un 20,2% a un 63,5% entre 1995 y 2010.

Aún así, la prevalencia de infección hallada por nuestro estudio está entre las más bajas de todas las recogidas en la literatura<sup>(41,42,44,46,126,128,136)</sup>.

El incremento en la prevalencia de tumores asociados al HPV, se ha visto acompañado de una reducción en la incidencia global de cáncer de orofaringe, que podemos atribuir a la progresiva reducción del porcentaje de fumadores en todos los grupos de edad, que se recoge en nuestra serie y que se viene observando a nivel nacional desde 1987<sup>(137,138)</sup>. No podemos tomar como verdad absoluta este descenso tan marcado (N=166 en los 1990 frente a N=82 en los 2000) en la incidencia de cáncer de orofaringe en nuestro medio, ya que existen otros centros hospitalarios dentro de nuestra área geográfica que pueden haber prestado atención a parte de los casos incidentes y haber quedado por tanto fuera de este análisis. Asimismo a partir del año 2005 se instaura un protocolo de tratamiento conservador para carcinomas de cabeza y cuello a base de quimiorradioterapia que también reduce el número absoluto de tumores que se tratan mediante cirugía y por tanto no son incluidos en el presente estudio.

Las cifras recogidas en el registro de tumores del Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA) desde el año 1997 hasta el año 2009, muestran una evolución bastante estable durante las dos décadas, con un muy leve incremento de incidencia, sobre todo debido a un aumento en los tumores de amígdala en el sexo femenino.

Sí observamos un aumento en la incidencia de tumores de amígdala en ambos sexos a partir de 2010. Curiosamente la incidencia de cáncer de amígdala en mujeres presenta un incremento marcado a partir del año 2010, donde solo en los primeros 5 años (2010-2015; N=39), se triplica el número de casos recogidos durante toda la década anterior (2000-2009; N=14). No obstante el porcentaje relativo de casos en mujeres frente a hombres, se muestra más

estable en la comparación con la década previa, observándose solo un discreto incremento. Probablemente el aumento en el número absoluto observado sea resultado de la unificación del registro de tumores y la suma de casos incidentes de otras áreas sanitarias.

En cualquier caso, en contra de lo observado en Estados Unidos<sup>(125)</sup> y en algunas series en Europa, como en Suecia, donde la incidencia viene incrementándose a ritmo vertiginoso desde 1990<sup>(44,139)</sup>, o en Inglaterra (con un incremento de un 58% entre 1995 y 2010)<sup>(140)</sup> en nuestro medio la incidencia de cáncer de orofaringe no está aumentando sensiblemente, porque ya era muy alta, asociada a las elevadas tasas de tabaquismo y consumo de alcohol de la población, lo que hace difícil sacar conclusiones sobre el papel del HPV en la incidencia de este tipo de tumor.

En 2008, un 27,8% de la población Asturiana fumaba<sup>(141)</sup>, y la modalidad de consumo intenso era la mayoritaria, superior al 50%, con tan solo un 17,9% de los fumadores con un consumo de tabaco moderado. En el 2012, aunque el porcentaje de fumadores diarios se reduce discretamente a un 25,4%, el porcentaje de fumadores intensos, de más de un paquete diario, se reduce sensiblemente a un 30% del total<sup>(142)</sup>. A nivel nacional según la encuesta de salud, en 2006, los fumadores de un paquete diario o más suponían solo un 11% de la población, con reducción a un 8% en 2011<sup>(137)</sup>. Esto muestra que el consumo de tabaco en Asturias permanece alto respecto al conjunto del país, y lleva un ritmo de descenso paralelo aunque discretamente superior a la tendencia nacional, acercándose paulatinamente a sus cifras.

En cuanto al consumo de alcohol, las cifras muestran aún un mayor consumo en nuestro medio, respecto al resto del país. Según se recoge en la encuesta de salud de 2012 el 14,8%, de la población asturiana declara haber consumido alcohol a diario en los últimos doce meses frente al 13,7% de la media nacional

y un 26,6% de manera bastante habitual (entre uno y cuatro días a la semana), frente a un 21% de la media nacional<sup>(137,142)</sup>. El consumo diario, se ha reducido casi un 10% desde 2008, por lo que la tendencia es similar a la observada con el tabaquismo.

De mantenerse esta tendencia, no sería raro que se mantuviese un paulatino descenso en la incidencia del cáncer de orofaringe, debido al descenso en la incidencia de tumores relacionados con los factores de riesgo clásicos, y será necesario analizar la evolución de la incidencia de tumores asociados al HPV. Nosotros detectamos un aumento desde 3 casos, asociados al mismo en la década de 1990 a 5 casos en la década de los 2000, por lo que la incidencia de carcinoma de orofaringe asociado al HPV ha aumentado un 60% en nuestra serie, en una década, desde 0,075 casos por 100.000 hab/año en los 1990 hasta 0,125 casos por 100.000 hab/año en los 2000, teniendo en cuenta una población de referencia para nuestro hospital de 400.000 habitantes y suponiéndola estable a lo largo de estas décadas. Aún así, el HPV en nuestro medio actualmente tiene un papel pequeño en cuanto a la incidencia global de carcinoma de orofaringe, y es necesario observar su evolución en los años venideros.

A la hora de observar las cifras globales de infección por el HPV en los grandes metaanálisis publicados, hay que tener en cuenta que tienen limitaciones que hay que considerar, como son la heterogeneidad en los métodos de detección del HPV, en muchas ocasiones la utilización de un test (PCR de ADN) que no permite diferenciar un virus contaminante de un virus con actividad carcinogénica, y la heterogeneidad en las poblaciones que se incluyen en el análisis. Como resultado tienden a una sobreestimación del papel del virus en los tumores de cabeza y cuello.

En un nuevo y reciente metaanálisis, publicado por Castellsagué et al<sup>(143)</sup>, la proporción de carcinomas de orofaringe atribuidos al HPV se reduce desde un 22,4% cuando se basa solo en la detección de ADN de HPV mediante PCR, a un 18,5% cuando se toman en cuenta la expresión de ARNm de E6/E7 y sobreexpresión de p16, lo cual apoya lo anteriormente expuesto.

A la hora de considerar medidas preventivas de salud pública, como la implantación de un programa de vacunación es mucho más conveniente basarse en estudios que determinen la carga de carcinomas de orofaringe atribuida al HPV, que tiene mucha más relación con la incidencia de tumores asociados al mismo, que con la proporción asociada al mismo en una determinada población<sup>(144)</sup>. Por ejemplo, una población con alta incidencia de carcinomas de orofaringe, pero una baja proporción atribuible al HPV puede tener una mayor carga de enfermedad atribuible al HPV, que otra población con una incidencia baja pero alta proporción atribuible al HPV.

Muy pocos estudios previos en población española sobre prevalencia de infección por HPV en carcinomas de cabeza y cuello se han publicado hasta el momento, entre ellos uno que incluía pacientes de Barcelona, Granada y Sevilla<sup>(145)</sup> y otro en 15 pacientes en Oviedo<sup>(146)</sup>. Ambos estudios recogieron la presencia de HPV tipo 16 en el 13,5% de los casos. Probablemente la proporción que detectamos actualmente es inferior debido a los métodos empleados en esos estudios, basados únicamente en la detección de material genético del virus por PCR sin tener en cuenta el papel carcinogénico del mismo con otros marcadores de actividad biológica.

No nos parece probable que los hallazgos de nuestro estudio reflejen una infraestimación, ya que se ha realizado una triple metodología de detección, y los diferentes análisis realizados son concordantes.

En un estudio reciente en nuestro país, publicado en 2014<sup>(147)</sup>, en una cohorte de 93 pacientes tratados en Madrid entre 2002 y 2008 de carcinoma de orofaringe en estadíos II a IV, se recoge una tasa de prevalencia de infección por HPV de un 26,7%. En este estudio, la tasa de hallazgo de ARNm de E6 de HPV en muestras fijadas con formalina e incluidas en parafina es solo de un 10%, y se atribuye el resultado a la degradación del mismo a lo largo del tiempo en las muestras procesadas, y a problemas técnicos en su extracción. Se toma por tanto como marcador de asociación al virus la sobreexpresión de p16 en las muestras, tomando como punto de corte una tinción intensa, nuclear y citoplasmática en más del 70% de las células, basándose en la alta correlación de esta determinación con la presencia de un virus biológicamente activo y oncológicamente relevante. Desde nuestro punto de vista, y en base a nuestros resultados, no podemos tomar como cierta esa estimación. El valor predictivo positivo (VPP) de una prueba de cribado, como podríamos considerar a la determinación de p16, depende, aún siendo muy sensible la misma, de la prevalencia en la población estudiada de la enfermedad en cuestión. Sin hallar la prevalencia de infección de tumores de orofaringe asociados al HPV en nuestro medio, no podemos utilizar la sobreexpresión de p16 como un test con alto VPP. Nuestros resultados demuestran que el valor predictivo positivo de la tinción intensa, nuclear y citoplasmática de p16(2+), que podría asemejarse a una tinción superior al 70% de las células en la escala utilizada en dicho estudio, no tiene un alto VPP en nuestro medio, ya que tiene una muy baja especificidad (hallamos 7 casos p16 2+/HPV negativo, frente a 8 casos p16 2+/HPV +), por lo que no podríamos estimar la prevalencia de infección por HPV basándonos en esta determinación. Nuestros resultados en la década 2000-2009, coincidente con el periodo de inclusión de los casos de este estudio, un 6,1% de tasa de detección del virus, se asemejan bastante más a la detección que este grupo hace mediante PCR de ARNm (10%), que a su estimación en base a p16. Desconocemos la validez de dicho resultado dado

que lo excluyen de su análisis por imposibilidad de testar sus resultados con la expresión de ARNm de otros tres genes control (B-actina, GAPDH y B-2-microglublina).

Una explicación posible para la baja proporción detectada en nuestra serie, puede ser una baja exposición al HPV, debido a una presencia inferior del virus en la población del Norte de España o a un comportamiento sexual diferente.

En cuanto a la difusión del virus en nuestro medio, y tomando como origen de la infección orofaríngea las prácticas sexuales de riesgo, como se ha propuesto por la comunidad científica internacional, existen estudios sobre la infección por HPV en muestras cervicales, que podemos utilizar como referencia.

Un reciente metaanálisis de los estudios europeos publicados entre 1995 y 2009 estimó que la prevalencia de HPV en muestras cervicales, mediante PCR, en mujeres con resultados citológicos normales es del 14,2% (IC del 95%, 14,1-14,4), pero observando gran variabilidad entre diferentes regiones y observándose una prevalencia menor en el sur de Europa (9%)<sup>(148)</sup>, lo que apoyaría una menor difusión del virus en nuestro país. Otros estudios, recogen una prevalencia de infección baja, como el de San José et al<sup>(149)</sup> que halla un 3% en población de Barcelona en 2003 y Agorastos et al<sup>(150)</sup>, que halla un 5,9% en Grecia en 2009. Esto confirma la variabilidad entre regiones en cuanto a la presencia del virus y la tendencia a una difusión baja en poblaciones del Sur de Europa.

En un estudio publicado en 2008 (de Oña et al), que estudió la prevalencia de infección por HPV en los 15 años previos (1992-2007) en muestras cervicales de población femenina del Norte de España (Asturias y Lugo), se recoge una prevalencia de infección por el HPV del 30% en todo el periodo, con un descenso gradual a lo largo del tiempo en cada subperiodo analizado, y también un descenso progresivo en los pacientes de más edad, dentro de los

diferentes grupos, estando en el último periodo estabilizada en torno a un 25%<sup>(151)</sup>.

En 2012 Castellsagué et al<sup>(152)</sup>, hacen un estudio de prevalencia de infección cervical por HPV en España, participando 3261 mujeres sin alteraciones en la citología, de las 17 comunidades autónomas, hallando una prevalencia estandarizada por edad del 14,3% para el conjunto del país, concordante con otros estudios en poblaciones europeas. El número de participantes incluidos de cada Comunidad Autónoma se determinó en base al censo poblacional de cada una de ellas, para conseguir una muestra representativa. A pesar de que los autores recogen que el estudio no tiene suficiente potencia estadística como para establecer diferencias entre las distintas Comunidades Autónomas, en el mismo se recoge una prevalencia de infección por HPV estandarizada por edad en Asturias de las más bajas del país (inferior al 10%), quedando solo por debajo de ella, Castilla y León y Cantabria, curiosamente con proximidad geográfica a nuestra área de estudio. Teniendo en cuenta que la prevalencia de infección recogida en este estudio en otras Comunidades Autónomas casi triplica la hallada en Asturias, este estudio podría apoyar una baja difusión del virus en nuestro medio que contribuyese (no de forma exclusiva), a la baja prevalencia de infección por HPV hallada en carcinomas de orofaringe.

El estudio de de Oña<sup>(151)</sup>, aún permitiendo obtener muchas más conclusiones en relación al papel del HPV en nuestro medio, incluye en el análisis pacientes que en el momento de su inclusión ya tienen alteraciones citológicas, algo que se ha demostrado asociado a la presencia del virus en un alto porcentaje de los casos y que el estudio confirma, pero puede suponer una sobreestimación en cuanto a la difusión del virus en la población general femenina de Asturias, y crear un sesgo en la comparación con otras áreas geográficas.

Otro estudio realizado en nuestro medio<sup>(153)</sup>, sobre prevalencia de infección por HPV en carcinomas de mucosa oral, no detecta el ADN del virus por PCR ni ISH en ninguno de los 125 casos analizados, siendo concordante con los resultados que presentamos en este trabajo.

En el reciente metaanálisis de Castellsagué et al<sup>(143)</sup>, se recoge la gran variabilidad entre las diferentes regiones analizadas, mostrando una prevalencia de infección por HPV en carcinomas de orofaringe para el sur de Europa sensiblemente más baja que en otras regiones Europeas y a nivel mundial, de entre el 7,6 y el 9,4% cuando se consideran estudios que asocian PCR de ADN y pruebas de actividad carcinogénica del virus (ARNm de E6 y/o sobreexpresión de p16). Estas cifras están mucho más próximas a las que nosotros detectamos en la década 2000-2009 que las previamente recogidas en otros metaanálisis.

Otra razón para la baja proporción hallada puede ser la particular composición de los pacientes de nuestra serie, que difiere en varios aspectos respecto de otras series publicadas:

- la proporción de hombres frente a mujeres es mucho más alta,
- la proporción de grandes fumadores y de grandes consumidores de alcohol es más elevada, y
- los tumores muestran una clasificación T y N relativamente más alta.

En todo caso, los pacientes de la serie han sido incluídos de forma consecutiva por lo que son representativos de los pacientes con cáncer de orofaringe de nuestro medio.

Un estudio publicado en 2011 por Ribeiro et al<sup>(154)</sup>, basado en la detección de ADN de HPV en carcinomas de cabeza y cuello utilizando el cebador PGMY09/11 para L1 en 507 carcinomas de cabeza y cuello dio como resultado

una prevalencia del 0,6%. Completaron el estudio con una PCR tipo-específica, para E7 de HPV16 en 197 tumores de orofaringe, laringe y cavidad oral, hallando una prevalencia del 3,1% en global y un 4,4% en tumores de orofaringe. El porcentaje de nunca fumadores (3,4%) y nunca bebedores (2,7%) en su serie fue como en la nuestra, muy baja, en comparación con otras series que hallan una prevalencia de infección por HPV mucho mayor. Por ejemplo de Souza et al<sup>(30)</sup>, hallan un porcentaje de tumores de orofaringe asociados al HPV de un 62,5%, en una serie en la que el 44% de los pacientes eran no fumadores, y el 15% no bebedores. Herrero et al<sup>(145)</sup> en un estudio de la IARC, hallan un porcentaje muy alto de tumores asociado al HPV, también en una serie con un 9% de no fumadores y 15% de no bebedores. Podría ser por tanto que en áreas geográficas donde los hábitos tóxicos clásicamente asociados a este tipo de tumores aún están muy presentes en la población, la tasa de tumores asociados al HPV permanezca baja.

Sin embargo, el número absoluto de tumores relacionados con la infección por HPV es también muy bajo en nuestra serie.

Estudios sobre la relación entre el hábito tabáquico, y el HPV en cuanto al riesgo de desarrollo de carcinoma de orofaringe ya se han publicado y en ellos se llega a la conclusión de que son factores de riesgo independientes<sup>(155)</sup>, y que tendrían un efecto sumatorio en cuanto al riesgo de aparición de un carcinoma de orofaringe, y en cuanto al pronóstico del mismo, una vez desarrollado.

Ang et al, en su estudio de 2010<sup>(45)</sup> llega a la conclusión de que el hábito tabáquico es un factor pronóstico independiente del status HPV, incrementando el riesgo de muerte y de recidiva o muerte por tumor, un 1% por cada paquete-año adicional de exposición al mismo que presente el paciente, siendo este incremento igual para tumores HPV-positivos, como

para tumores HPV-negativos. Categoriza a los pacientes como de bajo riesgo (tasa de supervivencia global del 93% a 3 años), de riesgo intermedio (tasa de supervivencia global a 3 años del 70,8%) y de alto riesgo (tasa de supervivencia global a 3 años del 46,2%). Los tumores HPV positivos, serían de bajo riesgo salvo los fumadores con una categoría N alta (N2b o N3), que pasarían a ser de riesgo intermedio. Los tumores HPV negativos serían todos de alto riesgo, salvo los no fumadores con una categoría T baja.

Una posible fuente de subestimación, dada la particular composición de nuestra serie, podría encontrarse en que la contribución a la cascada carcinogénica de los factores de riesgo clásicos, diferenciase una subclase de tumores, en los que existiese una infección por el HPV, pero esta no fuese identificada por nuestro protocolo, al producirse una inactivación mutacional de la vía molecular del gen *CDKN2A*, que impidiese la sobreexpresión de p16, a pesar de la desregulación de la vía molecular de pRb ejercida simultáneamente por la oncoproteína E7 del HPV de alto riesgo. Durante estas décadas, se ha tendido a dicotomizar los tumores de orofaringe, considerando dos vías carcinogénicas independientes, una asociada al virus del papiloma, y otra la clásica producida por insultos genéticos sucesivos desencadenados por la exposición a los carcinógenos del tabaco y del alcohol. Si en estudios como el previamente citado, se establece y demuestra un riesgo de recidiva y muerte superior en tumores HPV-positivos en relación a la exposición al tabaco, no es descabellado pensar que pueda existir una base molecular que lo justifique y que esos influjos carcinogénicos independientes, no sean dicotómicos, sino cooperativos. Estudios en esta línea pueden contribuir a arrojar una mayor luz sobre esta cuestión.

En todo caso, dado que aparte de la determinación por PCR en los tumores p16 positivos, en nuestro estudio realizamos ISH en todos los casos, con alto

grado de concordancia con los resultados basados en PCR, la probabilidad de falsos negativos por la hipótesis expuesta nos parece baja.

Y además comparando los casos según el año de diagnóstico se observa un incremento en la infección por HPV (desde 1,8% a un 6,1%) y una disminución en la proporción de grandes fumadores concordante con lo recogido en la literatura<sup>(40)</sup>.

Los carcinomas epidermoides de orofaringe HPV positivos han sido descritos como portadores de características únicas: menor edad al diagnóstico, menor exposición a tabaco y alcohol, menor clasificación T, mayor clasificación N, menor diferenciación, menor frecuencia de segundos primarios y sobre todo, mejor pronóstico<sup>(45)</sup>. Parece ser que la mayor supervivencia es debida a una mejor respuesta al tratamiento radioterápico, con o sin quimioterapia asociada<sup>(156)</sup>. Sin embargo, también con tratamiento quirúrgico aislado, los carcinomas epidermoides de mucosa oral HPV positivos han mostrado un mejor curso clínico<sup>(157)</sup>.

El análisis estadístico en nuestra serie se ve obstaculizado por el desbalance entre los casos HPV positivos (n=8) y los casos HPV negativos (n=240), pero nuestros datos muestran menor consumo de alcohol y tabaco, menor estadio tumoral, mejor supervivencia específica para enfermedad y menor desarrollo de segundos tumores primarios en los pacientes con tumores HPV positivos, lo cual es concordante con los datos publicados en la literatura. Además 7 de los 8 casos HPV positivos muestran el patrón de diferenciación basaloide que se ha asociado a la infección por HPV<sup>(120)</sup>. En nuestra serie no se detecta una menor edad al diagnóstico o una mayor clasificación N en los casos HPV positivos.

El hecho de no hallar diferencias en cuanto a la categoría N podemos atribuirlo a la baja prevalencia de tumores asociados al HPV en una cohorte extensa, con

una proporción de casos N2 y N3 muy alta (más de un 50% del total de la serie presenta una categoría N2b o superior) y donde solo un 24,5% de los casos HPV-negativos son N0.

## **II. Infección por HPV en carcinomas epidermoides de laringe e hipofaringe**

El papel de la infección por HPV en otras localizaciones del tracto aerodigestivo superior distintas a la orofaringe (cavidad oral, laringe e hipofaringe) ha sido recogido en numerosos estudios, pero existe una gran controversia en cuanto a su papel en la carcinogénesis. La significación de la infección por HPV en tumores de cabeza y cuello no orofaríngeos es incierta.

A pesar de haber sido eclipsada por la implicación demostrada del HPV en la carcinogénesis de tumores de orofaringe, la localización clásica de la infección por HPV en el tracto aerodigestivo superior ha sido la laringe, donde los HPV de bajo riesgo, tipos 6 y 11, se relacionan con la aparición de papilomas (papilomatosis laríngea).

La tasa de tumores de laringe e hipofaringe positivos para HPV varía ampliamente en la literatura, desde un 0% hasta un 75%(42,154,159-165).

En el caso de los carcinomas escamosos de laringe, los estudios con un mayor número de casos analizados muestran una prevalencia de infección por HPV inferior a la media, y que va desde un 7,4% (Gungor et al, 2007) hasta un 58,8% (Ma et al, 1998)(166-172), estimándose en torno a un 25% en el metaanálisis de Kreimer et al y otros similares llevados a cabo(42).

De forma similar, algunos estudios han investigado la relación entre la infección por HPV y los carcinomas de hipofaringe, con gran variabilidad de resultados(42,154,159,173).

Esta disparidad se ha relacionado con variaciones geográficas y con los distintos métodos de detección del HPV. Además la presencia de ADN del HPV

no indica necesariamente que el virus esté produciendo o contribuyendo al desarrollo o a la progresión del tumor. El ADN viral puede tener un papel silente y puede ser detectado en células no tumorales y en tejido normal del tracto aerodigestivo superior<sup>(159-161)</sup>. La prevalencia de infección por HPV en mucosa laríngea normal se ha visto que es superior al 19%<sup>(160,174-177)</sup>.

Nuestro estudio, basado en el protocolo de Smeets et al<sup>(109,126)</sup> ya previamente mencionado, detecta un 1,6% de casos positivos mediante PCR de HPV con cebadores específicos GP5+/GP6+ en una serie de 62 carcinomas epidermoides de laringe y 62 carcinomas epidermoides de hipofaringe. Realizamos ISH en los 124 casos, no detectando ningún caso positivo por medio de esta técnica, demostrándose así la mayor sensibilidad de la PCR para la detección del ADN del HPV. Esta prevalencia de infección está entre las más bajas de toda la literatura, pero en concordancia con un reciente estudio de prevalencia de HPV en dos regiones de alta incidencia de tumores de cabeza y cuello (América latina y Europa Central)<sup>(154)</sup> y con otras series recientes<sup>(162-165)</sup>.

En un estudio publicado en 2012 en el que se analizaron 73 casos de tumores de laringe e hipofaringe mediante amplificación de ADN por PCR e hibridación "in situ" de ARNm de E6 y E7, solo se hallaron dos casos positivos (2,7%), que correspondían ambos a tumores de laringe, siendo todos los casos de tumores de hipofaringe negativos. Esos dos casos presentaban sobreexpresión de p16<sup>(178)</sup>. Es importante reseñar, que al detectar ARNm se está evaluando la actividad biológica del virus de forma directa, y no tan solo de forma indirecta mediante la detección de sobreexpresión de p16. La conclusión a la que llegan estos investigadores es que el HPV es poco frecuente en carcinomas de laringe e hipofaringe y ponen en duda un papel etiológico del mismo en estos tumores.

Los datos procedentes de nuestro estudio no distan mucho de lo hallado por este grupo de investigación.

En un estudio previo en nuestro Hospital llevado a cabo en pacientes tratados entre 1991 y 1993, ninguno de los 13 casos de tumores de laringe y 2 de los 13 casos (13%) de tumores de hipofaringe analizados mostraron la presencia de ADN de HPV 16<sup>(146)</sup>. Probablemente la proporción que detectamos actualmente en tumores de hipofaringe sea menor debido a los métodos aplicados en dicho estudio para establecer la infección por HPV, que no permitían diferenciar una infección silente de una con implicación carcinogénica.

No nos parece probable que nuestros resultados reflejen una infraestimación dado que los diferentes análisis realizados son concordantes entre sí: una pequeña proporción de tumores del total de la serie mostraron el patrón inmunohistoquímico típico de los tumores asociados al HPV, positividad para p16 y negatividad para p53, y en ninguno de los casos fue positivo el estudio mediante ISH. Además nos parece probable que en los dos casos detectados como positivos, el HPV no esté etiológicamente relacionado con el tumor, ya que ambos son pacientes mayores (> 80 años), muy fumadores, ninguno mostró un patrón de diferenciación basaloide, y en el caso de laringe HPV positivo, p53 fue positivo en la IHQ. Todas estas características son opuestas a las que se describen en la literatura como asociadas a los tumores relacionados con la infección por HPV.

La presencia de ADN de HPV en algunos tumores puede deberse a la existencia de una infección silente, que tiene una muy baja carga viral que solo puede ser detectada por una técnica de alta sensibilidad como la PCR, como se ha demostrado en un estudio reciente en carcinomas epidermoides de laringe,

donde en solo 4 de 13 tumores HPV positivos por PCR se detectaba un virus transcripcionalmente activo<sup>(162)</sup>.

Esto también se demuestra en el reciente metaanálisis de Castellsagué et al<sup>(143)</sup>, en el que se reduce a un 1,5% los casos de carcinoma de laringe relacionados con el HPV desde un punto de vista carcinogénico, cuando aparte de la detección de ADN del virus por PCR, se analizan marcadores de actividad biológica como expresión de p16 y detección de ARNm.

Un resultado muy interesante es el que obtienen Wendt y Nasman, en 2013<sup>(179)</sup>. Publican una tasa de detección de ADN de HPV en 109 tumores de hipofaringe de tan solo un 6,4%, y solo en un 3,6% del total era detectado HPV tipo 16. Es de remarcar, que estos mismos autores recogen una prevalencia de infección por HPV en tumores de orofaringe de un 79% para casos correspondientes a los mismos años de estudio (2000-2007), por lo que evitamos el sesgo relativo a la variabilidad geográfica en la difusión del virus o hábitos sexuales, y nos permite observar la relativamente baja implicación del virus HPV en carcinomas de hipofaringe respecto a la localización en orofaringe, en un área geográfica con alta difusión del virus. La menor tasa de detección de HPV tipo 16 en tumores de cabeza y cuello no orofaríngeos HPV positivos ha sido observada en otras series y recogida en metaanálisis, como el de Mehanna, en 2013, donde el HPV tipo 16 suponía el 73,9% de los casos HPV positivos, frente al 95,7% en los tumores de orofaringe<sup>(46)</sup>.

Estos resultados en conjunto sugieren que el HPV no juega un papel determinante en el desarrollo de tumores de laringe e hipofaringe, y los resultados que hallamos en nuestro medio están en concordancia con la literatura. Una posible explicación a la baja proporción hallada en nuestra serie particular, puede estar en una menor presencia del virus en la población

general del Norte de España o a unos hábitos sexuales diferentes en la población, como ya se comentó para los tumores de orofaringe.

El análisis estadístico está sesgado en nuestra serie debido al desbalance entre los casos HPV positivos (N=2) y HPV negativos (N=122), y por ello no podemos establecer correlaciones pronósticas.

### III. Valor de p16 como marcador de infección por HPV en carcinomas de cabeza y cuello

P16 es un inhibidor de las quinasas dependientes de Ciclinas (CDK), 4 y 6, codificado en el gen supresor de tumores *CDKN2A*, localizado en el brazo corto del cromosoma 9 humano, en la región 9p21. En los tumores no relacionados con el HPV, p16 suele aparecer con niveles bajos o indetectables de expresión, por inactivación epigenética o mutacional de su gen codificante<sup>(180)</sup>.

La inactivación del gen *CDKN2A*, que conlleva la pérdida de la función de p16, por delección homocigótica, la metilación de su promotor, mutación puntual o reordenación génica ocurre hasta en un 80% de los casos de tumores de cabeza y cuello, lo que resulta en la ausencia completa de la expresión de dicha proteína<sup>(181)</sup>. Además, la expresión de p16 es baja o indetectable en las células normales, y limitada al núcleo<sup>(182)</sup>.

En los tumores relacionados con el HPV, la inactivación funcional de Rb ejercida por E7, produce la liberación del factor transcripcional E2F del complejo proteico E2F-Rb promoviendo la progresión del ciclo celular y al mismo tiempo produce una sobre-expresión del gen *CDKN2A* al desinhibirse la transcripción el mismo, dando como resultado una sobreexpresión de p16<sup>(183-185)</sup>. Por lo tanto, como la integración y transcripción del genoma viral es previa a la sobreexpresión de esta proteína, el aumento de la expresión de p16 en tumores HPV-positivos es relativamente fácil de detectar y ha demostrado ser un marcador sustituto razonable de la infección biológicamente activa por HPV.

Dada esta relación entre los tumores HPV-positivos y la sobreexpresión de p16, esta proteína ha sido usada como marcador de infección por HPV de alto

riesgo<sup>(186)</sup>, para confirmar y estadificar neoplasias intraepiteliales<sup>(187)</sup> y para predecir progresión o regresión de neoplasias de bajo grado<sup>(188)</sup> en tumores de cuello de útero. Igualmente, debido a la relación demostrada hoy día entre un subtipo de tumores de cabeza y cuello y el HPV, se ha estudiado y hallado esta expresión de p16 en muchos tumores de cabeza y cuello y se ha sugerido, de forma teórica, que se debe a la disfunción de Rb llevada a cabo por E7, proponiendo la sobreexpresión de p16 como un marcador sustituto razonable de la infección biológicamente activa por HPV en los tumores HPV-relacionados.

Wang et al, en 2013<sup>(189)</sup> realizan una revisión de los estudios publicados los 5 años previos que recogen expresión de p16 y detección de ADN de HPV por PCR o ISH<sup>(190-199)</sup>. Encuentran que la sensibilidad de p16 para predecir detección de ADN de HPV varía desde un 46% a un 93% entre estudios. A pesar de la relación establecida entre sobreexpresión de p16 e infección por HPV, de un 3 a un 51% de los tumores HPV negativos expresaban p16, y de un 2 a un 54% de los tumores HPV positivos no expresaban p16. Hay que tener en cuenta que en los estudios incluidos en este análisis había tumores de diferentes localizaciones y los criterios para considerar positividad de p16 variaban.

En relación con la detección de ADN del virus por ISH, p16 muestra una excelente sensibilidad pero baja especificidad (casos p16-positivo/HPV no detectado suponen del 18 al 51%)<sup>(190,192,197,199)</sup>. Con PCR ocurre algo similar pero a la inversa, debido a la elevada sensibilidad de la detección del virus por PCR (casos p16-negativos/HPV detectado suponen del 25-54%)<sup>(193,196,198)</sup>.

De todos los estudios incluidos en el análisis de Wang, el de Thavaraj et al<sup>(194)</sup> muestra una excelente concordancia entre expresión de p16 y detección de ADN de HPV, pero tomando como positividad para p16 cuando es una tinción

difusa, nuclear y citoplasmática y supera el 70% de las células, y además teniendo en cuenta que en esta serie los tumores incluidos son en su mayoría pobremente diferenciados.

Rischin et al<sup>(200)</sup> compararon la detección del ADN del HPV mediante PCR y la expresión de p16 mediante tinción inmunohistoquímica, y encontraron que el 10,8% de los tumores eran p16-positivos aunque la detección de ADN de HPV por PCR fue negativa. Esto mismo se observó en el estudio RTOG 0129, que mostró que la discrepancia era del 18,8% de casos p16-positivos/ HPV negativos por ISH.

Por tanto, existen en la literatura estudios múltiples que demuestran la no idoneidad del uso de p16 como un marcador sustituto único de la infección por HPV, por insuficiente sensibilidad<sup>(198,201-203)</sup> o especificidad<sup>(109,198,200,202,203)</sup>.

Se debe tender a mejorar el uso de p16, y establecer unos criterios, que lo hagan lo más útil posible disminuyendo el número de los casos de p16-positivo/HPV-negativo, sin aumentar los casos de p16-negativo/HPV-positivo.

Uno de los factores que pueden haber llevado a discordancias en cuanto al valor de la expresión de p16 como marcador sustituto de la infección por HPV, es el punto de corte de tinción inmunohistoquímica que se defina para caracterizar un tumor como p16-positivo, o como p16 sobreexpresado.

En la literatura encontramos numerosos ejemplos diferentes de clasificación:

Klaes et al<sup>(204)</sup> clasificaron la tinción de p16 como: negativa (< 1% de células positivas), esporádica (< 5% de células positivas), focal (< 25% de células positivas), y difusa (> 25% de células positivas) . Encontraron una correlación significativa entre la presencia de ADN del HPV de alto riesgo y la expresión de

p16 difusa e intensa. Este es el criterio de patrón de tinción más extendido y que más estudios recogen.

Utilizando los mismos criterios histológicos que Klaes et al, Hoffmann et al informaron que el 81,2% de los casos con detección positiva de ADN del HPV eran p16 positivos, pero que el 48,2% de los casos negativos para ADN del HPV, también eran p16 positivos, incluidos 3 casos con tinción difusa de p16. Además, no pudo detectar expresión de p16 en 3 de 14 lesiones de la serie, que contenían ADN y ARN del HPV. Concluyeron que el estado de expresión de p16 aislado, es inadecuado para identificar infecciones biológicamente activas o inactivas de HPV en cáncer de cabeza y cuello<sup>(205)</sup>.

Otros estudios han definido la expresión de p16 en tumores cuando es fuerte y difusa (citoplasma y núcleos), y cuando se tiñen  $\geq 70\%$  de las células <sup>(126,206)</sup>, mientras que Fischer et al evaluaron tumores como p16 positivos cuando  $\geq 5\%$  de las células eran inmunopositivas<sup>(207)</sup>.

Estos diversos sistemas de puntuación pueden conducir a discrepancias significativas entre los estudios en cuanto al valor de sensibilidad y especificidad de p16 para caracterizar un tumor como HPV positivo.

Como se observa en la revisión de Wang<sup>(189)</sup> la modificación de los criterios en cuanto a porcentaje e intensidad de tinción para establecer la positividad y/o sobreexpresión de p16, le añade más valor a esta determinación. Variando estos puntos de corte podemos modificar la sensibilidad y especificidad de la prueba según más interese en cada caso. En los casos en los que se aplica un protocolo diagnóstico interesa establecer un punto de corte de positividad de p16 que la haga muy sensible, para posteriormente aplicar un test más específico<sup>(109)</sup>.

Begum y Westra, en 2008 ya analizaron la cuestión de establecer un valor de corte específico para la positividad de p16, y concluyeron que una tinción por encima del 75% de las células de la muestra, o una tinción por encima del 50% combinada con áreas confluentes de positividad de tinción superiores al 25%, era un punto de corte adecuado para definir la positividad de p16 en relación con la infección por HPV<sup>(208)</sup>.

Larsen en 2014<sup>(209)</sup>, realizó un análisis de la sensibilidad de p16 para predecir la infección por HPV en tumores de orofaringe en función del criterio de sobreexpresión utilizado. Se incluyeron 39 estudios, que basaban la detección de ADN de HPV en PCR, ISH, o ambos y establecían sobreexpresión de p16 de forma cuantitativa (porcentaje de células teñidas) o verbal (tinción difusa e intensa).

La correlación entre detección de HPV y sobreexpresión de p16 fue numéricamente mayor, cuando esta sobreexpresión se definió como “tinción igual o superior al 70% de las células” con una sensibilidad de 0,927 (IC del 95%: 0,793-0,974) para identificar casos HPV-positivos. La definición verbal “tinción difusa e intensa”, mostró una sensibilidad de 0,791 (IC del 95%: 0,608-0,888) y la definición establecida en “tinción entre el 5 y el 69% de las células” mostró una sensibilidad de 0,894 (IC del 95%: 0,805-0,942). La tasa de falsos positivos fue inferior para la definición verbal (0.059; IC del 95%: 0.031-0.112) que para la definición “tinción superior al 70% de las células” (0.201; IC del 95%: 0.12-0.337).

A pesar de mostrar mayor correlación entre sobreexpresión de p16 y detección de HPV cuando se definía como “tinción igual o superior al 70% de las células”, no hallan diferencias significativas entre las diferentes definiciones de sobreexpresión de p16 en cuanto a su sensibilidad para predecir la existencia de infección por HPV.

A esta misma conclusión llega un reciente estudio, que compara la sensibilidad de distintos puntos de corte de tinción (>25% de las células teñidas, >50% de las células teñidas y >75% de las células teñidas), sin hallar diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad y especificidad para diagnosticar una infección por HPV como test único<sup>(143)</sup>, y finalmente deciden utilizar el valor inferior (>25% de las células teñidas) para su análisis.

Sin embargo, los puntos de corte por encima del 70 o 75% de las células se han ido imponiendo en los últimos años, siendo usados de un modo cada vez más frecuente en comparación con, por ejemplo, los valores superiores al 10% como definición "validada" de sobreexpresión de p16<sup>(45,195,210)</sup>.

En un estudio retrospectivo de La sociedad Danesa de Oncología de Cabeza y Cuello (DAHANCA), el punto de corte de tinción de p16 para definir sobreexpresión, se cambió en una Carta al Editor después de la publicación, desde el 10% de las células inicial, a un 70% de las células tras la rectificación<sup>(211)</sup>.

Nosotros realizamos nuestro estudio basándonos en el protocolo de Smeets et al<sup>(109)</sup>, validado para la detección de tumores de orofaringe asociados al HPV en muestras fijadas con formalina y embebidas en parafina con un sensibilidad del 96% y una especificidad del 98% en comparación con el Gold Standard. Dicho protocolo está basado en un estudio inmunohistoquímico que considera p16 positivo aquellas muestras que presentan tinción nuclear y citoplasmática moderada e intensa presente en más del 70% de las células<sup>(126)</sup>. El protocolo se completa con un estudio de detección de ADN del HPV por PCR utilizando los cebadores GP5+/6+, en los casos p16+. En los casos negativos con esta modalidad de PCR, se aplica una PCR específica para HPV16.

Modificamos los criterios de tinción de p16 hacia una escala verbal, estableciendo tres categorías: p16 negativos, los casos sin tinción, tinción

débil (1+), los casos con tinción nuclear y citoplasmática no intensa o inferior al 75% de las células y tinción fuerte (2+), los casos con tinción nuclear y citoplasmática difusa e intensa en más del 75% de las células. Esto lo hacemos ya que nos interesan unos criterios de positividad de p16 que doten a dicha determinación de la mayor sensibilidad, a pesar de perder especificidad, puesto que posteriormente vamos a realizar el test específico en los casos con tinción de p16 positiva (1+ y 2+).

En nuestra serie, 30 casos de 248 carcinomas de orofaringe (12%) fueron p16-positivos, 15 casos (6%) con una tinción débil (1+) y 15 casos con una tinción fuerte (2+). De ellos, en 8 (3,2% del total de carcinomas de orofaringe) se detectó ADN de HPV mediante PCR con cebadores GP5+/6+, y en 7 se detectó ADN de HPV por hibridación in situ. Todos los casos HPV-positivos presentaban una tinción de p16 positiva intensa(2+). En nuestra serie por tanto la concordancia de la tinción positiva intensa en más del 75% de las células (2+) con la presencia de HPV de alto riesgo es baja, un 53% con PCR y un 46% con ISH. Esto está en concordancia con lo recogido por otros autores para esta determinación, una alta sensibilidad pero una baja especificidad. Nuestros resultados por tanto no apoyan el utilizar esta determinación de forma aislada como un marcador de infección por HPV.

En cuanto a los tumores de laringe e hipofaringe 17 de 124 casos mostraron positividad para p16 en el análisis inmunohistoquímico, 9 con una tinción débil (p16 1+), que correspondían a 7 tumores de laringe y 2 de hipofaringe, y 8 con una tinción fuerte (p16 2+), 7 de laringe y 1 de hipofaringe.

Entre los casos p16 positivos, en 2 de ellos, un caso de laringe y un caso de hipofaringe, que presentaban tinción fuerte (p16 2+), se detectó ADN de HPV por PCR GP5+/6+ (1,6% del total de la serie para ambas localizaciones). Ambos contenían HPV tipo 16 tras el genotipado, y fueron positivos para RT-PCR de

ARNm de E6. Ninguno de los casos mostró ADN de HPV por ISH. En estas localizaciones, la concordancia con la tinción intensa de p16 (2+) con PCR fue muy baja, (12,5% en laringe y 33,3% en hipofaringe). Esto está en concordancia con lo hallado por otros autores<sup>(162,212-213)</sup>.

Chung et al<sup>(214)</sup> analizaron datos combinados de casos de carcinomas epidermoides no orofaríngeos de los ensayos RTOG 0129, 0234 y 0255, y detectaron que el 17,1% de los casos de carcinoma epidermoide de laringe y el 16,4% de los casos de carcinoma epidermoide de hipofaringe eran p16 positivos, con una concordancia con la detección de HPV baja, de 0,52 en laringe y 0,54 en hipofaringe.

En otro estudio de 324 pacientes con carcinoma de laringe, Young et al<sup>(215)</sup> observaron que el 6% de los casos eran positivos para p16 con un valor predictivo positivo (VPP) de infección por HPV de solo el 50%. Wilson et al<sup>(216)</sup> demostraron de forma similar que el 33% de los pacientes con tumores de hipofaringe eran p16 positivos, con un VPP para la detección de HPV del 38%. Resultados similares se hallan en un estudio reciente, con un VPP de detección de HPV del 30% para la expresión de p16 en carcinomas de laringe e hipofaringe<sup>(217)</sup>.

La discrepancia podría surgir de la pérdida de pRb sin infección por el HPV o por anomalías moleculares aún desconocidas en la regulación del ciclo celular pRb/p16. En un estudio limitado, se demostró que aproximadamente el 10% de los tumores de cabeza y cuello negativos para HPV presenta pérdidas de pRb por aneuploidía, lo que no puede diferenciarse a través del estudio inmunohistoquímico de expresión de p16 de la pérdida de pRb como resultado de la infección por HPV<sup>(218)</sup>.

Esto no hace más que profundizar en la necesidad de asociar al estado de p16, otras características tanto clínicas como epidemiológicas para estratificar en

qué pacientes esa positividad de p16 es relevante y debe ser estudiada más profundamente.

Particularmente es importante tener en cuenta el origen anatómico del tumor. En localizaciones anatómicas tales como la laringe o la cavidad oral, que no son preferentemente dianas del HPV, la probabilidad de que la sobreexpresión de p16 refleje la presencia de HPV transcripcionalmente activo es muy baja<sup>(162,212-213)</sup>.

Para algunos autores, para poder ser considerado como sustituto de otros tests, el estudio inmunohistoquímico de p16 debe ser informado atendiendo a consideraciones histológicas, anatómicas y clínicas<sup>(120)</sup>.

- P16 podría prescindir de otros tests confirmatorios cuando la tinción es fuerte, nuclear y citoplasmática en al menos un 70% de las células tumorales. Una tinción débil o focal debería apoyarse de otros métodos de detección complementarios.
- La sensibilidad y especificidad de p16 como marcador razonable de infección por HPV solo es válida en localizaciones orofaríngeas, nunca fuera de esta localización.
- La inmunohistoquímica debe informar además de las características histológicas típicas asociadas a los tumores HPV-relacionados. Una sobreexpresión de p16 sin características histológicas típicas, o la presencia de estas sin estudio inmunohistoquímico positivo, requeriría de un test adicional.
- Debe usarse como un marcador pronóstico en carcinomas de orofaringe, y cualquier decisión clínica basada en el establecimiento de infección por el HPV requiere de métodos más estrictos de detección.

A pesar de estas limitaciones de la determinación aislada de p16, la nueva clasificación TNM establece la nueva categoría para clasificar a los tumores orofaríngeos basándose en la determinación de esta proteína . Sin embargo, basándonos en nuestros hallazgos y lo anteriormente expuesto, es posible que esta nueva clasificación no sea adecuada en todas las áreas geográficas.

#### **IV. Valor de p16 como marcador pronóstico en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello**

##### **a) Carcinomas de la Orofaringe:**

Aparte de como marcador de infección biológicamente activa por HPV se ha investigado el valor pronóstico de la sobreexpresión de p16 en los tumores de cabeza y cuello. Dado que esta sobreexpresión en carcinomas de orofaringe se ha demostrado asociada en un porcentaje importante de los casos a la infección por HPV, y los tumores HPV relacionados han demostrado tener un mejor pronóstico, se ha investigado el valor de la sobreexpresión de p16 como marcador pronóstico aislado en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello.

En muchos de los estudios publicados se investiga como marcador pronóstico el estado de infección de HPV y sobreexpresión de p16 en conjunto, pero existen algunos que centran su objetivo en la sobreexpresión de p16 de forma independiente.

Rischin<sup>(200)</sup> et al, en 2010, publican parte de los resultados del ensayo clínico de fase III RTOG 0202, en el que estudian la respuesta de tumores de orofaringe en Estadio III y Estadio IV a quimiorradioterapia concomitante convencional (platino + 70 Gy) frente quimiorradioterapia con platino en menor dosis y un agente sensibilizante a la hipoxia, Tirapazamina. Estudiaron expresión de p16 y detección de ADN de HPV mediante ISH y PCR. La expresión de p16 fue puntuada semicuantitativamente por un patólogo según la intensidad de la tinción en el núcleo celular y el citoplasma. La intensidad se puntuó como 0 (ninguna), 1 (débil), 2 (moderada) o 3 (fuerte), con 0 o 1 puntuación definida como negativa y 2 o 3 definida como positiva. De 185 casos analizados, 106 (57%) según esta escala de intensidad de tinción fueron

positivas para p16. Los pacientes con p16-positivo de forma significativa, presentaron menor categoría T, mayor categoría N, mayor estadio, eran más jóvenes, y tenían una menor tendencia a ser fumadores actualmente.

La supervivencia global fue superior en el grupo p16-positivo en comparación con el grupo p16-negativo, con tasas de supervivencia a los 2 años de 91% y 74%, respectivamente (HR= 0,36; IC del 95% 0,17-0,74; p=0,004). La supervivencia libre de recidiva también fue superior, con tasas de supervivencia a los 2 años de 87% y 72%, respectivamente (HR=0,39; IC del 95% 0,20-0,74; p=0,003).

El análisis dentro de cada brazo de tratamiento demostró que, en el brazo de control, las tasas de supervivencia global a los 2 años fueron del 89% en los pacientes con tumores p16-positivos y del 68% en los pacientes con tumores p16-negativos (HR=0,34; IC del 95% 0,14-0,86; p=0,021). En el brazo de la Tirapazamina, las tasas de supervivencia global a los 2 años fueron de 94% y 80%, respectivamente (HR=0,36; IC del 95% 0,11-1,18; p=0,094). La prueba de interacción entre p16 y el brazo de estudio no fue estadísticamente significativa (p=0,95).

Observaron una mayor incidencia de fracaso locorregional en tumores p16-negativos y no se observaron apenas diferencias en cuanto a fracaso a distancia.

Aunque no hubo diferencias significativas en el grupo con p16 positivo, hubo una tendencia a un mejor control locorregional con Tirapazamina en los pacientes con p16 negativo. Este hallazgo es consistente con el análisis del ensayo DAHANCA que utiliza otro sensibilizador de células hipóxicas, Nimorazol, que halló un mejor control locorregional cuando este fármaco se añadió a la radioterapia, pero se restringió a los pacientes p16-negativos<sup>(219)</sup>.

Ang et al en 2010<sup>(45)</sup>, publican los resultados respecto a los tumores de orofaringe, del ensayo clínico randomizado RTOG 0129, llevado a cabo por el Radiation Therapy Oncology Group, para comparar el efecto de tratamiento de quimiorradioterapia convencional, frente a quimiorradioterapia con fraccionamiento acelerado en tumores de orofaringe, laringe, hipofaringe y cavidad oral en Estadio III y IV. Se estudia en estos tumores la presencia de ADN de HPV mediante ISH y la sobreexpresión de p16, definiendo la misma como la tinción intensa, difusa, nuclear y citoplasmática en más del 70% de las células. Observan que para tumores de orofaringe, la positividad de p16 se asocia de forma estadísticamente significativa con un mejor pronóstico, mostrando una tasa de supervivencia global a 3 años del 83,6% frente al 51,3% de los tumores p16-negativo, con un riesgo relativo para muerte de 0,29, y para recidiva o muerte de 0,33. La tasa de supervivencia libre de progresión a 3 años es del 74,4%, frente al 34,4% en los p16 negativos.

Rosenthal et al, en 2015<sup>(220)</sup>, hallan que los tumores de orofaringe p16-positivos tienen mejor pronóstico, con una mejor supervivencia global y específica para enfermedad y mejor control locorregional tanto en pacientes tratados con RT como en los tratados con RT + cetuximab. No encuentran asociación entre la expresión de p16 y el efecto de tratamiento.

En 2016, Shedghizadeh et al<sup>(221)</sup>, publican un metaanálisis sobre el valor pronóstico de p16 en tumores de orofaringe, donde tras el análisis estadístico, y basándose solo en estudios con un bajo riesgo de sesgo<sup>(45,200)</sup>, la expresión de p16 muestra un valor pronóstico independiente con una tasa favorable de supervivencia global (Riesgo relativo de 0,304). Asimismo presentan una tasa de supervivencia libre de enfermedad mejor (Riesgo relativo de 0,351).

La mayoría de estudios existentes se centran en el valor pronóstico de p16 tras tratamiento con radioterapia o quimiorradioterapia. Algunos estudios lo han estudiado también en relación a tratamiento quirúrgico.

En el estudio de Fischer et al<sup>(207)</sup> hacen un análisis del valor pronóstico de expresión de p16 tras tratamiento (Cirugía +/- RT frente a RT+/-QT concomitante), en 365 pacientes con tumores de cabeza y cuello incluyendo orofaringe, cavidad oral, laringe e hipofaringe.

La existencia de tinción nuclear en un número superior o igual al 5% de las células se consideró p16-positivo. La intensidad de tinción no se evaluó. Los tumores p16-positivo no se asociaron a menor categoría T ni mayor categoría N, tampoco se asociaron con desdiferenciación, ni con recidiva, tomando datos de todas las localizaciones en conjunto.

Sus datos sí muestran un valor pronóstico favorable de los casos p16-positivo (supervivencia a 5 años del 59,2% en tumores p16-positivo, frente al 39,2% en p16-negativo). Analizando la serie se observa que en ella hay una gran proporción de tumores de hipofaringe p16-negativo (33 de 38 para esta localización), que tienen un peor pronóstico y pueden alterar los resultados de supervivencia favoreciendo a los tumores p16-positivo en la comparación, mucho más frecuentes en otras localizaciones.

No observan diferencias significativas de supervivencia en cuanto a p16 en cavidad oral, laringe e hipofaringe de forma aislada. Sí en orofaringe donde la supervivencia a 5 años fue del 26,8% en tumores p16-negativo, frente a 57,1% en tumores p16-positivo.

En cuanto al tratamiento en el análisis multivariante, ajustando en cuanto a T, N y tratamiento, en el global de tumores de cabeza y cuello, p16 no muestra valor pronóstico. En el caso de los tumores de orofaringe, p16 muestra un

valor pronóstico independiente, tomando como valor positivo la tinción en un 5% de las células.

En nuestra serie, 30 de 248 tumores de orofaringe presentaron expresión positiva de p16, 15 con una tinción débil (1+), y 15 con una tinción difusa e intensa en más del 75% de las células (2+) mostrando una ligera mejor supervivencia específica y global sin hallar significación estadística ( $p=0,56$  y  $p=0,24$  respectivamente).

No observamos asociación de p16 con ningún parámetro clínico (tamaño del tumor, metástasis ganglionares o a distancia, recidiva, grado de diferenciación, ni estadio tumoral), por lo que nuestros datos no apoyan un valor pronóstico independiente a la expresión de p16.

Esta discordancia con lo hallado por otros grupos de investigación, podría deberse a que nuestra serie se compone de pacientes tratados mediante cirugía, mientras que la mayoría de los estudios publicados que observan un valor pronóstico positivo para la expresión de p16 se basan en tratamientos a base de radioterapia con o sin quimioterapia asociada.

Otra causa posible de la discordancia de nuestros resultados, podría ser que dado que la existencia de un tumor HPV-asociado se acompaña de expresión de p16, en las series publicadas que contengan una elevada proporción de tumores HPV-positivos, con un mejor pronóstico demostrado, esta positividad para HPV sea un factor de confusión que confiera el mejor pronóstico a los tumores p16-positivos. En cualquier caso en nuestro medio p16 no presenta un valor pronóstico independiente en carcinomas de orofaringe.

## **b) Carcinomas de Laringe e Hipofaringe**

En nuestra serie obtuvimos expresión positiva de p16 en 14 casos de laringe (22,5% del total) y 3 casos de hipofaringe (4,8% del total) por lo que parece que la expresión de p16 es más frecuente en tumores de laringe que en los de hipofaringe. No podemos relacionar esta expresión de p16 con la acción del HPV, ya que la detección de este fue negativa en la mayoría de los casos.

En los casos de laringe, 7 casos presentaron una tinción débil (p16 1+) y 7 casos presentaron una tinción fuerte (p16 2+). En carcinomas de hipofaringe 2 casos presentaron una tinción débil (p16 1+) y 1 caso una tinción fuerte (p16 2+).

Según los estudios previos realizados por otros grupos, p16 se encuentra inactivada en un 80% de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello<sup>(222,223)</sup>.

Smiegel et al<sup>(224)</sup>, realiza un estudio en el que asocia la pérdida de expresión de p16 en carcinomas epidermoides de laringe, con la detección de pérdida de heterocigosidad en el gen *CDKN2A* en un 73% de los casos e hipermetilación de su promotor en el 80,95% de los casos. Y además observa que a mayor grado tumoral, mayor número de alteraciones a nivel del gen *CDKN2A* aparecen, resultados que apoyan el importante papel en el proceso carcinogénico en tumores de laringe que parece jugar este gen.

En nuestra serie, teniendo en cuenta lo anterior, p16 se encuentra inactivada en un 77,5% de los tumores de laringe, por lo que los datos son congruentes con los existentes en la literatura, y en un 95,2% de los tumores de hipofaringe, sublocalización en la que encontramos una frecuencia de inactivación mayor. Podríamos justificar esa mayor tasa de inactivación de p16 en hipofaringe en nuestra serie por la gran proporción de grandes fumadores, asociación con inactivación de p16 ya descrita en otras series<sup>(225)</sup>.

En el análisis estadístico que realizamos para relacionar la expresión de p16 con las características clínico-patológicas y pronósticas de los tumores estudiados, vimos, que los tumores p16 negativos presentaban de forma significativa mayor frecuencia de ganglios afectados por el tumor.

Esto probablemente se deba a la mayor frecuencia de positividad para p16 en los tumores de laringe, que suelen presentar menor incidencia de metástasis ganglionares. El resto de asociaciones fueron todas no significativas. Se observa en nuestra serie una mejor supervivencia en los tumores p16 positivos, aunque las diferencias no alcanzan la significación estadística, probablemente por el escaso número de casos p16 positivos.

Kalfert et al<sup>(225)</sup>, realizan un estudio en 55 casos de carcinomas de laringe glóticos, hallando expresión de p16 en 15 pacientes (25,9%), tomando como positividad cualquier tinción. La expresión de p16 se asoció de forma significativa (75% Vs 18%) con los pacientes no fumadores y no hallaron relación con metástasis ganglionares, estadio tumoral, o grado de diferenciación.

Koscielny et al<sup>(226)</sup>, en 2007, publican un estudio sobre la tasa de inactivación de p16 en tumores de cabeza y cuello, concretamente en 67 tumores de orofaringe, laringe, hipofaringe y cavidad oral. Encuentra una tasa de inactivación de p16 en torno a un 50% en orofaringe, hipofaringe y laringe, y solo una tasa menor en cavidad oral (11%). Este estudio no halla asociación con características clínicas, ni implicaciones en la supervivencia global.

Danahey et al<sup>(227)</sup>, encuentran un mayor número de recurrencias en carcinomas de cabeza y cuello en relación con la inactivación de p16 en una pequeña muestra de 26 pacientes.

Meshman et al<sup>(217)</sup>, en 2016, realizan un estudio de expresión de p16 en 33 carcinomas epidermoides de laringe e hipofaringe, tratados con cirugía +/- RT y RT +/- QT concomitante. Hallaron positividad de p16 en el 45% del total, 25% en tumores de hipofaringe y 50% en tumores de laringe y no encuentran diferencias significativas en cuanto a supervivencia global, ni control locorregional. Los criterios de tinción positiva no parecen sobreestimar la positividad de p16 en este estudio ya que solo consideraron positividad cuando la tinción estaba presente en más del 70% de las células.

Young et al<sup>(215)</sup>, en 2015 sobre una muestra amplia de 307 casos de tumores de laringe, hallan expresión de p16 en el 20% de los casos, y una asociación de positividad de p16 con el sexo femenino, y con la afectación de ganglios linfáticos, discordante con nuestros resultados, ya que nosotros hallamos una mayor presencia de afectación de ganglios linfáticos en tumores p16-negativos. La supervivencia global no se ve afectada por el estado de expresión de p16 siendo del 79% a 2 años en ambos grupos, ni la supervivencia libre de recidiva (79% Vs 66% a 2 años en p16-positivo Vs p16-negativo).

Chung et al<sup>(214)</sup>, analizan los datos de los ensayos clínicos RTOG 0129, 0234 y 0255, incluyendo 356 casos de carcinomas epidermoides de cavidad oral, laringe e hipofaringe, y tomándolos todos en conjunto, los tumores p16-positivo muestran una mejora en la supervivencia (riesgo relativo de 0,63 y 0,56 respectivamente para supervivencia libre de progresión y supervivencia global). No así cuando se analizan de forma independiente, donde los tumores de laringe no muestran diferencias significativas, y los de hipofaringe muestran una mejor supervivencia libre de progresión (riesgo relativo=0,33) sin significación en cuanto a la supervivencia global. A tener en cuenta que la N más pequeña analizada fue precisamente la localización en hipofaringe (N=61), frente a laringe (N=181) y cavidad oral (N= 80) lo que hace tomar con cautela las conclusiones a las que llegan los autores.

En conclusión, la literatura muestra que la sobreexpresión de p16 en tumores de laringe e hipofaringe, no parece relacionarse con la infección por el HPV, y no parece estar relacionada con un beneficio en cuanto a la supervivencia o mejor pronóstico clínico. La asociación con determinadas características clínicas que se recogen en algunas series, como la nuestra, probablemente se deba al azar.

**V. Valor de p53 en el estudio de infección por HPV y como marcador pronóstico en carcinomas epidermoides de laringe, hipofaringe y orofaringe.**

P53 es el producto proteico de un gen supresor de tumores localizado en el brazo corto del cromosoma 17 (17p), denominado *TP53*. *TP53* está formado por once exones, de los cuales el primero no es codificante. La proteína p53 consta de 393 aminoácidos y comprende 4 regiones funcionales con diferentes funciones. Una vez activada, la proteína p53 puede inducir la parada del ciclo celular y la muerte celular.

P53 tiene una vida media muy corta, y es difícil de detectar en tejido sano. La proteína anómala, bien por mutación específica del gen codificante para la misma, por ausencia de degradación o por unión a otras proteínas permanece más tiempo en el tejido y por tanto es detectada en el estudio IHQ. En la interacción con el HPV, la oncoproteína E6 se une específicamente a p53 acelerando su degradación por un proceso de ubiquitinación, por lo que en los tumores en los que el HPV es oncológicamente activo los niveles de p53 son indetectables.

La mutación de *TP53* y la consecuente inactivación, supone una pérdida de función. Normalmente en un gen supresor de tumores, la mutación del mismo debe producirse en los dos alelos, ya que la expresión de la mutación es recesiva. En los tumores de cabeza y cuello, basándose en estudios en líneas celulares, se ha propuesto que la mutación en un alelo, produce que el alelo nativo sea borrado, y por tanto el fenotipo mutado se exprese. Las mutaciones en *TP53* se encuentran en un 40-50% de los tumores de cabeza y cuello<sup>(228)</sup>.

El tipo más frecuente de mutación es la missense mutation, donde se cambia una o más bases de un codón desencadenando un cambio en el aminoácido que codifica. Concretamente en la región central de unión específica al ADN de la proteína es donde se han identificado más mutaciones, suponiendo más del 79% de todas las identificadas<sup>(228)</sup>. Como estas mutaciones se producen fuera del dominio de tetramerización, la mayoría de p53 mutantes pueden formar tetrámeros<sup>(229)</sup>.

En tumores de cabeza y cuello la mayoría de las mutaciones descritas se producen en los exones localizados entre el 5 y 8. Diferentes mutaciones, pueden alterar diferentes propiedades de p53, como su capacidad de unión al ADN. Asimismo también existen situaciones en que una proteína p53 no mutada presenta una mayor estabilidad, dadas las complejas relaciones de regulación de la misma.

En numerosos estudios, se ha demostrado que en tumores que albergan un estado nativo del gen *TP53*, y por tanto una proteína p53 no mutada, esta puede ser igualmente no funcionante. Esto es lo que sucede en los tumores asociados a la infección por el HPV de alto riesgo, donde la oncoproteína E6 compite con MDM2 por la unión a p53, se une a ella y activa una ubiquitin-ligasa celular, que desencadena la ubiquitinación de p53 y su degradación en el proteosoma<sup>(230)</sup>.

La proteína mutada normalmente tiene una mayor vida media, lo que hace que sea fácilmente detectada por IHQ. Los anticuerpos utilizados en el estudio IHQ reconocen tanto la p53 mutada, como la nativa, y no hay manera de diferenciarlas mediante este estudio. Cuando una p53 nativa se estabiliza y es retenida en los tejidos y por tanto detectada en la IHQ, es importante tener en cuenta que es una proteína anómala, no activa, bien por unión a otras proteínas que han provocado su retención o a estar parcialmente degradada.

Hay una buena correlación entre sobreexpresión de p53 y mutación de p53<sup>(231)</sup>, pero no es del 100%, ya que hay mutaciones que pueden desembocar en la ausencia de detección de p53, bien por ser formas truncadas no reactivas a los anticuerpos o por suponer la mutación una ausencia total de expresión de la proteína<sup>(232)</sup>.

Dado que en epitelios escamosos sanos, p53 es normalmente indetectable, se han realizado estudios orientados a determinar si la expresión de p53 se relaciona con las características clínico-patológicas y con el pronóstico en tumores de cabeza y cuello, pero no se ha logrado establecer una relación clínico-patológica y pronóstica de forma consistente entre estudios en base a la expresión de p53.

En carcinomas epidermoides de laringe se han realizado múltiples estudios, algunos de los cuales han hallado relación entre la expresión de p53 con un peor pronóstico<sup>(233,234)</sup>. Otros muchos estudios, no han llegado a establecer ninguna relación significativa, y otros han hallado resultados contradictorios, por lo que la inconsistencia de los resultados no ha permitido conferir un valor pronóstico a esta proteína en estos tumores.

Además fruto de la complejidad de la regulación de la expresión de p53, el estudio inmunohistoquímico positivo no siempre se relaciona con la existencia de una proteína p53 mutada de forma directa, tal como se comentó, lo cual complica el establecimiento de conclusiones sólidas.

En nuestra serie, en carcinomas de laringe e hipofaringe, en cuanto a p53, observamos un patrón de tinción nuclear en más del 10% de las células (relacionado con estados mutados del gen *TP53*) en 73 casos (58,9%), correspondiendo a 37 casos de tumores de laringe y 36 casos de tumores de hipofaringe. En tumores de orofaringe, hallamos este patrón de tinción de p53 en 145 casos (58,4%), sin observar diferencias entre las sublocalizaciones

“amígdala” (58%) y “base de lengua” (60%). En numerosos estudios publicados en la literatura, se recogen unas cifras de mutación de p53 en carcinomas epidermoides de cabeza y cuello de en torno al 50%<sup>(235,236)</sup> por lo que nuestros resultados son congruentes y ligeramente elevados. No se observan diferencias entre todas las localizaciones y sublocalizaciones estudiadas.

No podemos relacionar la ausencia de expresión inmunohistoquímica de p53 con la infección por el HPV, ya que este es positivo en un porcentaje muy bajo en el total de la serie, y hallamos una expresión de p53 concordante con un estado nativo del gen *TP53* en otros muchos tumores no relacionados con el HPV. Es importante remarcar, que todos los casos de carcinomas de orofaringe de nuestra serie en los que detectamos la presencia del HPV siguiendo nuestro protocolo de detección, el patrón inmunohistoquímico de p53 es congruente con lo esperado para estos tumores, con ausencia de expresión inmunohistoquímica de p53, que se asocia a un estado nativo del gen *TP53* y a la degradación de la proteína por la interacción con E6. Estos resultados están en concordancia con lo publicado para los tumores HPV-relacionados, apareciendo en el 100% de los casos de nuestra serie en orofaringe.

En el reciente metaanálisis de Castellsagué et al<sup>(143)</sup>, se analiza la concordancia de la ausencia de expresión de p53 en los tumores HPV-positivos estando presente en un 92,8% de los mismos, por lo que nuestros resultados son congruentes. Dada la simplicidad del estudio se podría plantear su uso en la práctica clínica para completar el estudio inmunohistoquímico de un tumor de orofaringe p16-positivo, dada la escasa especificidad mostrada por esta determinación en nuestro medio, y de confirmarse la ausencia de expresión de p53, proceder a la detección del HPV de forma más específica (PCR o ISH).

En el único caso HPV-positivo de carcinoma de laringe, en cambio, observamos expresión positiva de p53, incongruente con lo esperado para un tumor HPV-

relacionado, por lo que nos reafirma en la idea de la no implicación carcinogénica del virus en los casos HPV-positivos no orofaríngeos de nuestro estudio, y en el papel escasamente relevante del HPV en este tipo de tumores. Esto también es congruente con los resultados de Castellsagué et al<sup>(143)</sup>, donde hallan una ausencia de expresión de p53 solo en el 69,6% de los casos HPV-positivos en esta localización.

En el análisis estadístico que realizamos para relacionar el patrón de tinción nuclear de p53 con las características clínico-patológicas de los tumores estudiados, observamos que los casos sin recidiva tumoral (analizando los datos de recidiva local regional y locorregional de forma global) presentan una mayor positividad para p53, de forma estadísticamente significativa tanto para laringe e hipofaringe como para orofaringe. Esta asociación del estado mutado de p53 y la aparición de menos recidivas tumorales ya ha sido vista en otros estudios publicados en la literatura, aunque otros estudios encuentran lo contrario, y la mayoría no encuentra ninguna relación, por lo que probablemente se deba al azar, ya que no hemos hallado otras asociaciones entre la expresión de p53 y los parámetros clínico-patológicos.

Los tumores con tinción inmunohistoquímica concordante con un estado mutado de p53 de nuestra serie, también muestran una tendencia a presentar una mayor supervivencia específica y global sin hallar diferencias significativas para todas las localizaciones. Como se comentó con anterioridad, el estado del gen *TP53* y la expresión de la proteína p53, y su relación con el pronóstico del tumor ha sido estudiada en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello obteniéndose resultados heterogéneos. Existen publicaciones en las que se estudia la expresión de p53 en los carcinomas epidermoides de cabeza y cuello y su relación con el pronóstico del tumor, llegando a la conclusión de que la expresión de p53, no produce un cambio en el pronóstico si se analizan los

carcinomas epidermoides de cabeza y cuello globalmente, pero sí empeora el pronóstico si se analizan solo carcinomas epidermoides de laringe<sup>(237)</sup>.

En nuestra serie, tanto en tumores de laringe e hipofaringe como de orofaringe, se observa una tendencia a una mejor supervivencia en los tumores p53-positivos, siendo las diferencias significativas en los carcinomas de laringe e hipofaringe ( $p=0,041$ ) y mostrando una evidencia menor en tumores de orofaringe ( $p=0,08$ ). No obstante existe controversia y datos contradictorios en la literatura<sup>(238)</sup>. Algunas investigaciones sugieren que el valor pronóstico hallado para los tumores laríngeos puede reflejar el hecho de que estos epitelios están expuestos fundamentalmente al efecto carcinogénico del tabaco, mientras que los tumores que ocurren en la cavidad oral y la orofaringe están asociados con un rango más amplio de factores de riesgo como el alcohol, el HPV y las bacterias.

En cuanto a la importancia pronóstica de las mutaciones en el gen supresor *TP53*, los resultados publicados difieren de unos estudios a otros<sup>(238)</sup>. Algunos estudios lograron establecer relación pronóstica negativa con mutaciones específicas localizadas en el dominio de unión al ADN<sup>(239,240)</sup>, pero esta asociación no se ha confirmado en estudios más amplios. Sin embargo, en otros estudios, cuando se restringe el análisis a tumores con mutaciones que provocan un cambio importante en la proteína p53, estas mutaciones se convierten en una variable independiente asociada a una mayor supervivencia<sup>(237)</sup>. El patrón de tinción nuclear de p53 se asocia a un estado mutado del gen *TP53*, por lo que el resultado obtenido en nuestro estudio de una mayor supervivencia sería congruente con lo publicado.

Las evidencias acumuladas, y el paulatino esclarecimiento del papel de otras proteínas de la familia de p53, como las proteínas p63 y p73, sugieren que tratar de estudiar la expresión de p53 como marcador pronóstico aislado es

demasiado simplista, sobre todo porque esta vía molecular casi siempre se ve alterada en la cascada carcinogénica, muchas veces de forma indirecta por efecto de otras mutaciones, incluso cuando la proteína p53 y su gen codificante es de tipo nativo<sup>(241)</sup>.



## **6. CONCLUSIONES**



- La infección por HPV de alto riesgo tiene un papel pequeño pero con tendencia creciente en la carcinogénesis de los carcinomas de orofaringe de nuestro medio, estando presente en un 1,8% de los casos diagnosticados en la década 1990-1999, aumentando hasta un 6,1% en la década de 2000-2009.
- La infección por HPV de alto riesgo no parece tener un papel oncológicamente relevante en los tumores de laringe e hipofaringe en nuestro medio.
- El serotipo presente en todos nuestros casos es el HPV-16, confirmando que es el más frecuentemente asociado con los carcinomas de cabeza y cuello
- Los tumores de orofaringe asociados al HPV presentan un patrón de expresión inmunohistoquímica de p16 y p53 característico, que consiste en una sobreexpresión de p16, con una tinción difusa e intensa en más del 75% de las células y ausencia de expresión de p53.
- La sobreexpresión de p16 muestra una sensibilidad del 100% en la detección del HPV, pero no muestra una adecuada especificidad ni un alto valor predictivo positivo para predecir la infección por HPV de alto riesgo en carcinomas epidermoides de orofaringe, laringe e hipofaringe en nuestro medio, por lo que no es recomendable basar decisiones terapéuticas en esta determinación de forma aislada.
- Los tumores de orofaringe asociados a la infección por el HPV en nuestra serie muestran una mejor supervivencia, aunque sin alcanzar la significación estadística.
- La expresión de p16 no muestra un valor pronóstico independiente en ninguna de las localizaciones estudiadas.
- La expresión de p53 se asocia de forma estadísticamente significativa con la ausencia de aparición de recidiva tumoral en todas las localizaciones estudiadas. Consecuentemente la expresión de p53 se

asocia a una mayor supervivencia, aunque solo alcanza la significación estadística en carcinomas de laringe e hipofaringe.

## **7. BIBLIOGRAFÍA**



1. Jemal A et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011; 55:74-108
2. Siegel R et al. Cancer statistics, 2013. *CA cancer J Clin*, 2013; 63:11-30
3. Maier H, Tüsch M. Epidemiology of laryngeal cancer: result of the Heidelberg case-control study. *Acta Otolaryngol (Stockh)*, 1997; 527:160-164
4. Quer M, León X, Orús C et al. Análisis de 2500 carcinomas escamosos de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 2001; 52:201-205
5. Lechuga R, Martín C, Mínguez I et al. Estudio del carcinoma de laringe en mujeres. *Acta Otorrinolaringol Esp*, 2005; 51:129-132
6. Parkin DM, Whelan SL, Ferlay J et al. Cancer Incidences in five continents. Vols I a VIII. Lyon: IARC Press; 2005
7. <http://dep.iarc.fr/globocan/globocan.htm>
8. <http://dep.iarc.fr/dataava/globocan/who.htm>
9. Canto MT, Devessa SS. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncol*, 2002; 38:610-617
10. Burch JD, Howe GR, Miller AB et al. Tobacco, alcohol, asbestos, and nickel in the etiology of cancer of the larynx: a case-control study. *J Natl Cancer Inst*, 1981; 67:1219-1224
11. Zeka A, Gore R, Kriebel D. Effects of alcohol and tobacco on aerodigestive cancer risks: a meta regression analysis. *Cancer Causes Control*, 2003; 14:897-906
12. Homann N, Tillonen J, Meurman JH et al. Increased salivary acetaldehyde levels in heavy drinkers and smokers: a microbiological approach to oral cavity cancer. *Carcinogenesis*, 2000; 21(4):663-668
13. Dietz A, Ramroth H, Urban T et al. Exposure to cement dust, related occupational groups and laryngeal cancer risk: results of a population based case-control study. *Int J Cancer*, 2004; 108:907-911
14. Esteve J, Riboli E, Péquignot G et al. Diet and cancers of the larynx and hypopharynx: the IARC multicenter study in southwestern Europe. *Cancer Causes Control*, 1996; 7:240-252
15. Vaezi MF, Qadeer MA, Lopez R et al. Laryngeal cancer and gastroesophageal reflux disease: a case-control study. *Am J Med*, 2006; 119:768-776
16. Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Takes RP, Silver CE, Paccagnella D, Rinaldo A, Hinni ML, Ferlito A. Relationship between reflux and laryngeal cancer. *Head Neck*, 2013; 35(12):1814-1818

17. Schantz SP, Zhang ZF, Spitz MS et al. Genetic susceptibility to head and neck cancer: interaction between nutrition and mutagen sensitivity. *Laryngoscope*, 1997; 107:765-781
18. Yu GP, Zhang ZF, Hsu TC et al. Family history of cancer, mutagen sensitivity and increased risk of head and neck cancer. *Cancer Lett*, 1999; 146:93-101
19. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*, 2010; 11(8):781-789
20. Muñoz et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003; 348:518-527
21. Hariri et al. Prevalence of genital human papillomavirus among females in the United States, the National Health and nutrition examination survey 2003-2006. *J Infect Dis*, 2011; 204:566-573
22. Giuliano AR et al. The human papillomavirus infection in men study: prevalence and type distribution among men residing in Brazil, Mexico and United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2008; 17:2036-2043
23. Pickard RK et al. The prevalence and incidence of oral human papillomavirus infection among young men and women aged 18-30 years. *Sex Transm Dis*, 2012; 39:559-566
24. Gillison ML et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States of America, 2009-2010. *JAMA*, 2012; 307:693-703
25. IARC working group on the evaluation of Carcinogenic Risks to humans. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 1995; 64:1-378
26. Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2002; 396:342-350
27. Kayes O et al. Molecular and genetic pathways in penile cancer. *Lancet Oncol*, 2007; 8:420-429
28. Gillison ML et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92:709-720
29. Weinberger PM et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favourable prognosis. *J Clin Oncol*, 2006; 24:736-747

30. D'Souza G et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 2007; 356:1944-1956
31. Schwartz SM et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*, 1998; 90:1626-1636
32. Bajos N et al. Changes in sexual behaviours: from secular trends to public health policies. *AIDS*, 2010; 24:1185-1191
33. Smith EM et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*, 2004; 108:766-772
34. Lang Kuhs KA1, Pawlita M2, Gibson SP3, Schmitt NC4, Trivedi S5, Argiris A6, Kreimer AR1, Ferris RL7, Waterboer T. Characterization of human papillomavirus antibodies in individuals with head and neck cancer. *Cancer Epidemiol*, 2016; 42:46-52
35. Syrjanen KJ et al. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg*, 1983; 21(2):147-53
36. Syrjanen KJ et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*, 1983; 12(6):418-424
37. De Villiers EM et al. Papillomavirus ADN in human tongue carcinomas. *Int J Cancer*, 1985; 36:575-578
38. Steinberg BM, DiLorenzo TP. A possible role for human papillomaviruses in head and neck cancer. *Cancer metastasis Rev*, 1996; 15:91-112
39. Chaturvedi et al. Incidence trends for human papillomavirus-related and unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*, 2008; 26:612-619
40. Sturgis EM et al. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*, 2007; 110:1429-1435
41. Chaturvedi et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*, 2011; 29:4294-4301
42. Kreimer et al. Human papillomavirus types in head and neck carcinomas worldwide. *Cancer epidemiol Biomarkers Prev*, 2005; 14:467-475
43. Termine N et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a metanalysis. *Ann Oncol*, 2008; 19:1681-1690

44. Nasman A et al. Incidence of human papillomavirus positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma. *Int J Cancer*, 2009; 125:362-366
45. Ang KK et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 2010; 363:24-35
46. Mehanna H et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and non-oropharyngeal head and neck cancer. Systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head and Neck*, 2012; 35(5):747-755
47. Munger K et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol*, 2004; 78:11451-11460
48. Stubenrauch F, Laimins LA. Human papillomavirus life cycle: active and latent phases. *Semin Cancer*, 1999; 9:379-386
49. Bedell MA et al. Amplification of human papillomavirus genomes in in vitro is dependent on epithelial differentiation. *J Virol*, 1991; 65:2254-2260
50. Doorbar J. The papillomavirus life cycle. *J Clin Virol*, 2005; 2(Suppl 1):S7-15
51. Cheng S et al. Differentiation-dependent up-regulation of the human papillomavirus E7 gene reactivates cellular ADN replication in suprabasal keratinocytes. *Genes Dev*, 1995; 9:2335-2349
52. Scheffner et al. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Science*, 1990; 248:76-79
53. Scheffner M et al. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*, 1993; 75:495-505
54. Kesis TD et al. Human papillomavirus 16 E6 expression disrupts the p53-mediated cellular response to ADN damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90:3988-3992
55. Klingelutz AJ et al. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature*, 1996; 380:79-82
56. Dyson SN et al. The human papillomavirus 16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 1989; 243:934-937
57. Boyer SN et al. E7 protein of human papillomavirus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res*, 1996; 56:4620-4624

58. Demers GW et al. Growth arrest by induction of p53 in ADN damaged keratinocytes is bypassed by human papillomavirus 16 E7. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994; 91:4382-4386
59. Slebos RJ et al. p53-dependent G1 arrest involves pRB-related proteins and is disrupted by the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein. *Proc Natl Sci USA*, 1994; 91:5320-5324
60. Kiyono T et al. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature*, 1998; 396:84-88
61. Funk JO et al. Inhibition of CDK activity and PCNA dependent ADN replication by p21 is blocked by interaction with the HPV 16 E7 oncoprotein. *Gens Dev*, 1997; 11:2090-2100
62. Flores ER et al. The human papillomavirus type 16 E7 oncogene is required for the productive stage of the viral life cycle. *J Virol*, 2000; 74:6622-6631
63. Mclaughlin-Drubin ME et al. The role of the human papillomavirus type 18 E7 oncoprotein during the complete viral life cycle. *Virology*, 2005; 338:61-68
64. Duensing S et al. Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int J Cancer*, 2004; 109:157-162
65. Srivenugopal KS et al. The ADN repair protein O(6)-methylguanine-ADN methyltransferase is a proteolytic target for the E6 human papillomavirus oncoprotein. *Oncogene*, 2002; 21:5940-5945
66. Hughes FJ, Romanos MA. E1 protein of human papillomavirus is a ADN helicase/ATPase. *Nucl Acids Res*, 1993; 21:5817-5823
67. You J et al. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral ADN to host mitotic chromosomes. *Cell*, 2004; 117:349-360
68. Roman A, Munger K. The papillomavirus E7 proteins. *Virology*, 2013; 445(1-2):138-168
69. Vande Pol SB, Klingelhutz AJ. Papillomavirus E6 oncoproteins. *Virology*, 2013; 445(1-2):115-137
70. Crum CP, Nuovo G, Friedman D, Silverstein SJ. Accumulation of RNA homologous to human papillomavirus type 16 open reading frames in genital precancers. *J Virol*, 1988; 62:84-90
71. Zhang P, Nouri M, Brandsma JL, Iftner T, Steinberg BM. Induction of E6/E7 expression in cottontail rabbit papillomavirus latency following UV activation. *Virology*, 1999; 263:388-394

72. Bodily JM, Hennigan C, Wrobel GA, Rodriguez CM. Regulation of the human papillomavirus type 16 late promoter by E7 and the cell cycle. *Virology*, 2013; 443(1):11-19
73. Flores ER, Lambert PF. Evidence for a switch in the mode of human papillomavirus type 16 DNA replication during the viral life cycle. *J Virol*, 1997; 71(10):7167-7179
74. Ozbun MA, Meyers C. Characterization of late gene transcripts expressed during vegetative replication of human papillomavirus type 31b. *J Virol*, 1997; 71(7):5161-5172.
75. Ozbun MA, Meyers C. Human papillomavirus type 31b E1 and E2 transcript expression correlates with vegetative viral genome amplification. *Virology*, 1998; 248(2):218-230
76. Spink KM, Laimins LA. Induction of the human papillomavirus type 31 late promoter requires differentiation but not DNA amplification. *J Virol*, 2005; 79(8):4918-4926
77. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus Genes*, 2002; 24:275–90.
78. You J, Croyle JL, Nishimura A, Ozato K, Howley PM. Interaction of the bovine papillomavirus E2 protein with Brd4 tethers the viral DNA to host mitotic chromosomes. *Cell*, 2004; 117:349-360
79. Petrik DT, Schmitt KP, Stinski MF. Inhibition of cellular DNA synthesis by the human cytomegalovirus IE86 protein is necessary for efficient virus replication. *J Virol*, 2006; 80(8):3872-3883
80. De Smet M, Kanginakudru S, Rietz A, Wu W, Roden R, Androphy EJ. The replicative consequences of papillomavirus E2 protein binding to the origin replication factor ORC2. *PLoS pathogens*, 2016; 12(10):e1005934
81. Doorbar J. Latent papillomavirus infections and their regulation. *Curr Opin Virol*, 2013; 3:416-421
82. Jiang M, Milner J. Selective silencing of viral gene expression in HPV-positive human cervical carcinoma cells treated with siRNA, a primer of RNA interference. *Oncogene*, 2002; 21(39):6041-6048
83. Butz, K, Ristriani, T, Hengstermann, A, Denk, C, Scheffner, M, Hoppe-Seyler, F. siRNA targeting of the viral E6 oncogene efficiently kills human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene*, 2003; 22(38):5938-5945

84. Frattini MG, Lim HB, Laimins LA. In vitro synthesis of oncogenic human papillomaviruses requires episomal genomes for differentiation dependent late gene expression. *Proc Natl Acad Sci*, 1996; 93:3062-3067
85. Lace MJ et al. Keratinocyte clones express chimeric Virus-Cell mRNAs similar to those found in cervical cancers. *J Virol*, 2011; 85:1645-1654
86. Alazawi W et al. Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16. *Cancer Res*, 2002; 62: 6959-6965
87. Choo KB et al. Molecular analysis of cellular loci disrupted by papillomavirus 16 integration in cervical cancer: frequent viral integration in topologically destabilized and transcriptionally active chromosomal regions. *J Med Virol*, 1996; 49:15-22
88. O'Brien P et al. Evasion of host immunity direct by papillomaviruses-encoded proteins. *Virus Res*, 2002; 88:103-117
89. Reiser J, et al. High risk papillomaviruses repress constitutive kappa interferón transcription via E6 to prevent pathogen recognition receptor and antiviral-gene expression. *J Virol*, 2011; 85:11372-11380
90. Hasan UA et al. TLR9 expression and function is abolished by the cervical cancer-associated human papillomavirus type 16. *J Immunol*, 2007; 178:3186-3197
91. Egawa N, Doorbar J. The low risk papillomaviruses. *Virus Research*. <http://dx.Doi.org/10.1016/j.virusres.2016.12.017>
92. Moody CA et al. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*, 2010; 10(8):556-560
93. von Knebel Doeberitz M et al. New markers for cervical displasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*, 2002; 38(17):2229-2242
94. Bodelon C. et al. Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers. *Int J Cancer*, 2016; 139(9):2001-2011
95. Ritchie JM et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer*, 2003; 104:336-344
96. Li Y et al. Transcriptional repression of the D-type cyclin dependent kinase inhibitor p16 by the retinoblastoma susceptibility gene product pRb. *Cancer Res*, 1994; 54:6078-6082

97. Sidransky D. Molecular genetics of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*, 1995; 7:229-23
98. Gillison ML, Shah KV. Human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma: mounting evidence for an etiologic role for human papillomavirus in a subset of head and neck cancers. *Curr Opin Oncol*, 2001; 13:183-188
99. Reed AI, Califano J et al. High frequency of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 1996; 56:3630-3633
100. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head and neck cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, 2008; 5(1):24-31
101. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*, 2001; 92:805-813
102. Li W et al. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous cell carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer*, 2003; 106:553-558
103. Mc Neil C. HPV in oropharyngeal cancers: new data inspire hope for vaccines. *J Natl Cancer Inst*, 2000; 92:680-681
104. Posner MR et al. Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial. *Ann oncol*, 2011; 22:1071-1077
105. Huang SH et al. Natural course of distant metastases following radiotherapy or chemoradiotherapy in HPV related oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*, 2013; 49:79-85
106. Huang SH et al. Temporal nodal regression and regional control after primary radiation therapy for N2-N3 head and neck cancer stratified by HPV status. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2013; 87:1078-1085
107. Mirghani H, Amen F, Moreau F, Guigay J, Ferchiou M, Melkane AE, et al. Human papillomavirus testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know. *Oral Oncol*, 2014; 50:1-9
108. Weichert W et al. Molecular hpv typing as a diagnostic tool to discriminate primary from metastatic squamous cell carcinoma of the lung. *Am J Surg Pathol*, 2009; 33:516-520
109. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*, 2007; 121:2465-2472

110. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordonez B, He X, Pickard R, Koluder M, et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in cooperative group trials. *Am J Surg Pathol*, 2012; 36:945-954
111. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, et al. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer*, 2002; 102:152-158
112. Westra WH. Detection of human papillomavirus in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. *Oral Oncol*, 2014; 50(9):771-779
113. Ukpo OC, Flanagan JJ, Ma XJ, Luo Y, Thorstad WL, Lewis Jr JS. High-risk human papillomavirus E6/E7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2011; 35:1343-1350.
114. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 2012; 14:22-29.
115. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Jones TM, Ma XJ, Wang H, et al. Validation of a novel diagnostic standard in hpv-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 2013; 108:1332-1329.
116. Bishop JA, Ma XJ, Wang H, Luo Y, Illei PB, Begum S, et al. Detection of transcriptionally active high-risk HPV in patients with head and neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA in situ hybridization method. *Am J Surg Pathol*, 2012; 36:1874-1882.
117. Hoffmann M, Ihloff AS, Gorogh T, Weise JB, Fazel A, Krams M, et al. P16(ink4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer*, 2010; 127:1595-1602.
118. Lewis Jr JS. P16 immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*, 2012; 6(Suppl. 1):S75-82.
119. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*, 2010; 116:2166-2173.

120. El-Naggar AK, Westra WH. P16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck*, 2012; 34:459-461
121. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*, 2010; 116(9):2166-2173
122. Rautava J et al. Biology of human papillomavirus infections in head and neck carcinogenesis. *Head Neck Pathol*, 2012; 6(Suppl 1):S3-15.
123. Westra WH. The morphologic profile of hpv-related head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis, and clinical management. *Head Neck Pathol*, 2012; 6(Suppl 1):S48-54
124. Singhi AD et al. Lymphoepithelial-like carcinoma of the oropharynx: a morphologic variant of hpv-related head and neck carcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2010; 34:800-805.
125. Shiboski CH et al. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the US population ages 20-44 years. *Cancer*, 2005; 103:1843-1849
126. Rietbergen MM, Leemans CR, et al. Increasing prevalence rates of HPV attributable oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands as assessed by a validated test algorithm. *Int J Cancer*, 2013; 132:1565-71
127. Lopez F, Llorente JL, et al. Gene amplification and protein overexpression of EGFR and ERBB2 in sinonasal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 2012; 118:1818-26
128. Schache AG, Liloglou T, et al. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res*, 2011; 17:6262-71.
129. Chiesa F et al. Surfing prognostic factors in head and neck cancer at the millennium. *Oral Oncol*, 1999; 35:590-596
130. Helliwelli TR. Molecular markers of metastasis in squamous carcinomas. *J Pathol*, 2001; 194:289-293
131. Lopes MA et al. Biomarkers predictive of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillof Surg*, 2002; 60:142-167
132. Rodrigo JP, Martínez P, Allonca E, Alonso-Durán L, Suárez C, Astudillo A, García-Pedrero JM. Immunohistochemical markers of distant metastasis in

- laryngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinomas. Clin Exp Metastasis, 2014; 31(3):317-325
133. Ragin CC et al. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. Int J Cancer, 2007; 121:1813-1820
  134. Zhang MQ et al. Detection of human papillomavirus-related squamous cell carcinoma cytologically and by in situ hybridization in fine needle aspiration biopsies of cervical metastasis: a tool for identifying the site of an occult head and neck primary. Cancer, 2008; 114(2):118-123
  135. Bonilla-Velez J et al. Impact of human papillomavirus on oropharyngeal cancer biology and response to therapy: implications for treatment. Otolaryngol Clin North Am, 2013; 46:521-543
  136. Ndiaye et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4A detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol, 2014; 15:1319-1331
  137. Ministerio de Sanidad y Consumo. Encuesta Nacional de Salud- España 1987, 1993, 1995, 1997 y 2001, 2006, 2011.  
<http://pestadistico.inteligenciadegestion.mssi.es/>
  138. Fernández E et al. Prevalencia de tabaco en España entre 1945 y 1995. Reconstrucción a partir de las Encuestas Nacionales de Salud. Med Clin, 2003;120(1):14-16
  139. Näsman A et al. Incidence of human papillomavirus positive tonsillar and base of tongue carcinoma: a stabilisation of an epidemic of viral induced carcinoma? Eur J Cancer, 2015; 51(1):55-61
  140. Louie KS, Mehanna H, Sasieni P. Trends in head and neck cancers in England from 1995 to 2011 and projections up to 2025. Oral Oncol, 2015; 51:341-348
  141. Encuesta de salud para Asturias 2008.  
[https://www.asturias.es/Astursalud/Ficheros/AS\\_Salud%20Publica/AS\\_Drogas/Observatorio/consumodetabaco\\_1.pdf](https://www.asturias.es/Astursalud/Ficheros/AS_Salud%20Publica/AS_Drogas/Observatorio/consumodetabaco_1.pdf)
  142. Encuesta de salud para Asturias 2012.  
[https://www.asturias.es/Astursalud/Ficheros/ASSalud%Publica/As\\_Vigilancia/Encuesta de Salud/ESA 2012](https://www.asturias.es/Astursalud/Ficheros/ASSalud%Publica/As_Vigilancia/Encuesta de Salud/ESA 2012)
  143. Castellsagué X et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. J Natl Cancer Inst, 2016; 108(6): djv403

144. 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):3235-42
145. Herrero R, Castellsague X, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1772-1783
146. Alvarez Alvarez I, Sanchez Lazo P, et al. Using polymerase chain reaction to human papillomavirus in oral and pharyngolaryngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol*, 1997; 18:375-381.
147. Cerezo L et al. Oropharyngeal cancer related to human papillomavirus: incidence and prognosis in Madrid, Spain. *Clin Transl Oncol*, 2014; 16(3):301-306
148. Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, Ferrer E, Bosch FX, de Sanjose. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: Meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings. *J Infect Dis*, 2010; 202:1789-1799
149. de Sanjosé S, Almirall R, Lloveras B, Font R, Diaz M, Muñoz N, Catalá I, Meijer CJ, Snijders PJ, Herrero R, Bosch FX. Cervical human papillomavirus infection in the female population in Barcelona, Spain. *Sex Transm Dis*, 2003; 30:788-793.
150. Agorastos T, Lambropoulos AF, Sotiriadis A, Mikos T, Togaridou E, Emmanouilides CJ. Prevalence and distribution of high risk human papillomavirus in Greece. *Eur J Cancer Prev*, 2009; 18:504-509.
151. De Oña M et al. Prevalence, evolution, and features of Infection with Human Papillomavirus: a 15-Year longitudinal study of routine screening of a women population in the North of Spain. *J Med Virol*, 2010; 82:597-604
152. Castellsagué et al. Prevalence and genotype distribution of Human Papillomavirus infection of the cervix in Spain: The CLEOPATRE Study. *J Med Virol*, 2012; 84:947-956
153. Rodriguez-Santamarta T, Rodrigo JP et al. Prevalence of human papillomavirus in oral squamous cell carcinomas in northern Spain. *Eur Arch Otorrhinolaryngol*, 2016; 273(12):4549-4559
154. Ribeiro KB 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
155. Anantharaman D et al. Combined effects of smoking and HPV16 in oropharyngeal cancer. *Int J Epidemiol*, 2016; 0:1–10

156. Psyrri A, Cohen E. Oropharyngeal cancer: clinical implications of the HPV connection. *Ann Oncol*, 2011; 22:997-999
157. Licitra L, Perrone F, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 2006; 24:5630-5636.
158. Hong A, Lee CS, Jones D, et al. Rising prevalence of human papillomavirus related oropharyngeal cancer in Australia over the last two decades. *Head Neck*, 2016; 38(5):743-750
159. Isayeva T et al. Human papillomavirus in non oropharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol*, 2012; 6:S104-S120
160. Torrente MC, Rodrigo JP et al. Human papillomavirus infections in laryngeal cancer. *Head Neck*, 2011; 33:581-586
161. Duray A et al. High incidence of high risk HPV in benign and malignant lesion of the larynx. *Int J Oncol*, 2011; 39:51-59
162. Chernock RD et al. Detection and significance of human papillomavirus, *CDKN2A* (p16) and *CDKN1A* (p21) expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol*, 2013; 26:223-231
163. Maier M et al. Human papillomavirus in squamous cell cancer of the head and neck. A study at the Ulm Military hospital, Germany. *HNO*, 2013; 61:593-601
164. Halec G et al. Biological evidence for a causal role of HPV 16 in a small fraction of laryngeal squamous cell carcinoma. *Dr J Cancer*, 2013; 109:172-183
165. Lee SY et al. Is human papillomavirus a causative factor of glottic cancer? *J Voice*, 2011; 25:770-774
166. Syrjanen S, Syrjanen K, Mantyjarvi R, et al. Human papillomavirus DNA in squamous cell carcinomas of the larynx demonstrated by in situ DNA hybridization. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 1987; 49:175-186
167. Salam MA, Rockett J, Morris A. General primer-mediated polymerase chain reaction for simultaneous detection and typing of human papillomavirus DNA in laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Otolaryngol*, 1995; 20:84-88

168. Ma XL, Ueno K, Pan ZM, Hi SZ, Ohyama M, Eizuru Y. Human papillomavirus DNA sequences and p53 over-expression in laryngeal squamous cell carcinomas in Northeast China. *J Med Virol*, 1998; 54:186-191
169. Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, et al. Human papillomavirus (HPV) is possibly involved in laryngeal but not in lung carcinogenesis. *Hum Pathol*, 1999; 30:274-283
170. de Oliveira DE, Bacchi MM, Macareno RS, Tagliarini JV, Cordeiro RC, Bacchi CE. Human papillomavirus and Epstein-Barr virus infection, p53 expression, and cellular proliferation in laryngeal carcinoma. *Am J Clin Pathol*, 2006;126:284-293
171. Gungor A, Cincik H, Baloglu H, Cekin E, Dogru S, Dursun E. Human papillomavirus prevalence in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Laryngol Otol*, 2007; 121:772-777
172. Morshed K, Polz-Dacewicz M, Szymanski M, Polz D. Short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of human papillomaviruses in laryngeal squamous cell carcinoma and normal mucosa: clinico-pathological evaluation. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 2008; 265(Suppl 1):S89-S96
173. Ragin CC et al. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer*, 2007; 121:1813-1820
174. Smith EM, Summersgill KF, Allen J, et al. Human papillomavirus and risk of laryngeal cancer. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 2000; 109:1069-1076
175. García-Millán R, Hernández H, Panadé L, et al. Detection and typing of human papillomavirus DNA in benign and malignant tumours of laryngeal epithelium. *Acta Otolaryngol*, 1998; 118:754-758
176. Fukushima K, Ogura H, Watanabe S, Yabe Y, Masuda Y. Human papillomavirus type 16 DNA detected by the polymerase chain reaction in non-cancer tissues of the head and neck. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 1994; 251:109-112
177. Rihkanen H, Peltomaa J, Syrjanen S. Prevalence of human papillomavirus (HPV) DNA in vocal cords without laryngeal papillomas. *Acta Otolaryngol*, 1994; 114:348-351
178. Lewis JS Jr, Ukpo OC, Ma XJ, Flanagan J, et al. Transcriptionally-active high-risk human papillomavirus is rare in oral cavity and laryngeal/hypopharyngeal

- squamous cell carcinomas: a tissue microarray study utilizing E6/E7 mRNA in situ hybridization. *Histopathology*, 2012; 60(6):982-91
179. Wendt M. et al. Presence of human papillomaviruses and p16 expression in hypopharyngeal cancer. *Head Neck*, 2014; 36(1):107-12
  180. Nobori T, Miura K, Wu DJ et al. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 1994; 368: 753–6
  181. Cairns P, Polascik TJ, Eby Y, et al: Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet*, 1995; 11:210-212
  182. Grütgen A, Reichenzeller M, Jünger M, et al. Detailed gene expression analysis but not microsatellite marker analysis of 9p21 reveals differential defects in the INK4a gene locus in the majority of head and neck cancers. *J Pathol*, 2001; 194:311-317
  183. Khleif SN, DeGregori J, Yee CL et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996; 93:4350-4354
  184. Dyson N, Howley PM, Munger K et al. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*, 1989; 243:934-937
  185. Munger K, Werness BA, Dyson N et al. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *EMBO J* 1989; 8:4099-4105
  186. Sano T, Oyama T, Kashiwabara K et al. Expression status of p16 protein is associated with human papillomavirus oncogenic potential in cervical and genital lesions. *Am J Pathol*, 1998; 153:1741-1748
  187. Mulvany NJ, Allen DG, Wilson SM. Diagnostic utility of p16INK4a: a reappraisal of its use in cervical biopsies. *Pathology*, 2008; 40:335-344
  188. Carozzi F, Gillio-Tos A, Confortini M et al. Risk of high-grade cervical intraepithelial neoplasia during follow-up in HPV-positive women according to baseline p16-INK4A results: a prospective analysis of a nested substudy of the NTCC randomised controlled trial. *Lancet Oncol*, 2013; 14:168-176
  189. Wang et al. P16INK4A as a surrogate biomarker for human papillomavirus-associated oropharyngeal carcinoma: Consideration of some aspects. *Cancer Sci*, 2013; 104(12):1553-1559

190. Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B et al. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *J Clin Oncol*, 2009; 27: 6213-6221.
191. Nasman A, Andersson E, Nordfors C et al. MHC class I expression in HPV positive and negative tonsillar squamous cell carcinoma in correlation to clinical outcome. *Int J Cancer*, 2013; 132:72-81.
192. Lewis JJ, Thorstad WL, Chernock RD et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol*, 2010; 34:1088-1096.
193. Hong AM, Dobbins TA, Lee CS et al. Human papillomavirus predicts outcome in oropharyngeal cancer in patients treated primarily with surgery or radiation therapy. *Br J Cancer*, 2010; 103:1510-1517.
194. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol*, 2011; 64:308-312.
195. Evans MF, Matthews A, Kandil D et al. Discrimination of 'driver' and 'passenger' HPV in tonsillar carcinomas by the polymerase chain reaction, chromogenic in situ hybridization, and p16(INK4a) immunohistochemistry. *Head Neck Pathol*, 2011; 5:344-348.
196. Junor E, Kerr G, Oniscu A et al. Benefit of chemotherapy as part of treatment for HPV DNA-positive but p16-negative squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Br J Cancer* 2012; 106:358-365.
197. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *Am J Surg Pathol*, 2012; 36:945-954.
198. Holzinger D, Schmitt M, Dyckhoff G et al. Viral RNA patterns and high viral load reliably define oropharynx carcinomas with active HPV16 involvement. *Cancer Res*, 2012; 72:4993-5003.
199. Gao G, Chernock RD, Gay HA et al. A novel RT-PCR method for quantification of human papillomavirus transcripts in archived tissues and its application in oropharyngeal cancer prognosis. *Int J Cancer*, 2013; 132:882-890.

200. Rischin D, Young RJ, Fisher R, et al: Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *J Clin Oncol*, 2010; 28:4142-4148
201. Begum S et al. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2005; 11(16):5694-5699
202. Smith EM et al. P16INK4A expression, human papillomavirus and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol*, 2008; 44(2):133-142
203. Holzinger D et al. Identification of oropharyngeal squamous cell carcinoma with active HPV16 involvement by immunohistochemical analysis of the retinoblastoma protein pathway. *Int J Cancer*, 2013; 133(6):1389-1399
204. Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, Dallenbach-Hellweg G, Schmidt D and von Knebel Doeberitz M. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer*, 2001; 92:276-284
205. Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, Henry H, Pfannenschmidt S, Burkhardt C, Gorogh T, Halec G, Hoffmann AS, Kahn T, Rocken C, Haag J, Waterboer T and Schmitt M. HPV DNA, E6-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer Lett*, 2012; 323:88-96
206. Singhi AD and Westra WH: Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*, 2010; 116:2166-2173
207. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, Tornillo L, Wolfensberger M and Terracciano LM: Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer*, 2010; 126:1256-1262
208. Begum S, Westra WH. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status. *Am J Surg Pathol*, 2008; 32(7):1044-1050
209. Larsen CG et al Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumors: a systematic review. *Br J Cancer*, 2014; 110:1587-1594

210. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, et al. Evaluation of human papillomavirus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clin Cancer Res*, 2011; 17(19):6262-6271
211. Lassen P, Overgaard J. Scoring and classification of oropharyngeal carcinoma based on HPV-related p16 expression. *Radiother Oncol*, 2012; 105(2):269-270
212. Bishop JA, Ma XJ, Wang H, Luo Y, Illei PB, Begum S, et al. Detection of transcriptionally active high-risk HPV in patients with head and neck squamous cell carcinoma as visualized by a novel E6/E7 mRNA in situ hybridization method. *Am J Surg Pathol*, 2012; 36:1874-1882
213. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*, 2013; 49:1-8.
214. Chung CH, Zhang Q, Kong CS, et al. p16 protein expression and Human Papillomavirus status as prognostic biomarkers of non oropharyngeal Head and Neck Squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*, 2014; 32(35):3930-3938
215. Young RJ, Urban D, Angel C, et al. Frequency and prognostic significance of p16(INK4A) protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 2015; 112(6):1098-1104
216. Wilson DD, Rahimi AS, Saylor DK, et al. P16 not a prognostic marker for hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2012; 138(6):556-561
217. Meshmann J et al. Prognostic significance of p16 in squamous cell carcinoma of the larynx ad hypopharynx. *Am J Otolaryngol*, 2017; 38(1):31-37
218. 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 Res*, 1998; 58:5-13
219. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, et al: HPV-associated p16- expression and response to hypoxic modification of radiotherapy in head and neck cancer. *Radiother Oncol*, 2010; 94:30-35
220. Rosenthal D et al. Association of Human Papillomavirus and p16 Status with outcomes in the IMCL 9815 Phase III registration trial for patients with locoregionally advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma of the

- Head and Neck treated with radiotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol*, 2015; 33:1-11
221. Sedghizadeh P et al. Is p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma associated with favorable prognosis? A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*, 2016; 54:15-27
  222. Van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, et al. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early and neck cancer progression. *Cancer Res*, 1994; 54:1156-1158
  223. Rodrigo JP, Suárez C, González MV, Lazo PS, Ramos S, Coto E, Alvarez I, García LA, Martínez JA. Variability of genetic alterations in different sites of head and neck cancer. *Laryngoscope*, 2001; 111(7):1297-1301
  224. Smiegel R. Inactivation of the Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A) Gene in Squamous Cell Carcinoma of the Larynx. *Mol Car*, 2004; 39:147-154
  225. Kalfert D et al. The Role of Protein p16INK4a in glottic laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*, 2014; 20(4):909-915
  226. Koscielny S et al. The prognostic relevance of p16 inactivation in head and neck cancer. *ORL*, 2007; 69:30-36
  227. Danahey DG, Tobin EJ, Schuller DE, Bier-Laning CM, Weghorst CM, Lang JC: p16 mutation frequency and clinical correlation in head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 1999; 119: 285-288
  228. Greenblatt MS et al. Mutations in the p53 tumour suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 1994; 54:4855-4878
  229. Chène p. In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. *J Mol Biol*, 1998; 281:205-209
  230. Mantovani F, Banks L. The human papillomavirus E6 protein and its contribution to malignant progression. *Oncogene*, 2001; 20:7874-7887
  231. Hall PA et al. P53 in tumor pathology: can we trust immunohistochemistry? *J Pathol*, 1994; 172:1-4
  232. Nylander K et al. P53 mutations, protein expression and cell proliferation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer*, 1995; 71:826-830
  233. Jin YT et al. The prognostic significance of the biomarkers p21, p53 and bcl2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 1998; 82: 286-291

234. Narayanan A et al. Is p53 an independent prognostic factor in patients with laryngeal carcinoma? *Cancer*, 1999; 82:286-291
235. Chin D, Boyle GM, Theile DR, Parsons PG, Coman WB. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg*, 2004; 57: 595-602
236. Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. *N Engl J Med*, 2001; 345:1890-1900
237. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med*, 2000; 29(9):413-425
238. Partridge M, Gaballah K, Huang X. Molecular markers for diagnosis and prognosis. *Cancer Metast Rev*, 2005; 24:71–85
239. Yamazaki Y, Chiba I, Hirai A, Sugiura C, Notani K, Kashiwazaki H, Tei K, Totsuka Y, Fukuda H. Specific p53 mutations predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 2003; 39:163-169
240. Bosch FX, Ritter D et al. Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value. *Int J Cancer*, 2004; 111:530-538
241. Pertridge M et al. New insights into p53 protein stabilisation in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*, 1999; 35:45-55

