



ARTIGO ORIGINAL

## Assessment of HPV 16, HPV 18, p16 expression in advanced stage laryngeal cancer patients and prognostic significance ☆,☆☆



Selman Dogantemur <sup>a</sup>, Suleyman Ozdemir <sup>b,\*</sup>, Aysun Uguz <sup>c</sup>,  
Ozgun Surmelioglu <sup>b</sup>, Muhammed Dagkiran <sup>b</sup>, Ozgur Tarkan <sup>b</sup> e Ulku Tuncer <sup>b</sup>

<sup>a</sup> Kadirli State Hospital, Department of Otorhinolaryngology Head & Neck Surgery, Osmaniye, Turquia

<sup>b</sup> Cukurova University School of Medicine, Department of Otorhinolaryngology Head & Neck Surgery, Adana, Turquia

<sup>c</sup> Cukurova University School of Medicine, Department of Pathology, Adana, Turquia

Recebido em 9 de julho de 2019; aceito em 12 de novembro de 2019

Disponível na Internet em 27 de abril de 2020

### KEYWORDS

Larynx;  
Squamous cell carcinoma;  
HPV;  
p16;  
Alcohol

### Abstract

**Introduction:** Human papilloma virus is an etiological risk factor for a subset of head and neck squamous cell carcinomas. HPV has been proven to be a powerful prognostic biomarker for oropharyngeal cancer, but its role in the larynx has not been explored in depth. The developmental mechanisms of laryngeal carcinomas are quite complex and controlled by various factors. Smoking and alcohol are most important risk factors. Recent studies indicate that HPV infection also plays an important role in larynx carcinomas. HPV related laryngeal carcinomas especially occur at the supraglottic region of larynx.

**Objective:** We aimed to determine the frequency of HPV/protein16 positivity in patients with laryngeal carcinoma and association of HPV and/or p16 positivity with variables such as age, sex, smoking habits, tumor localization, lymph node metastasis, recurrence and survival in advanced stage laryngeal carcinoma in our study.

**Methods:** This retrospective study included 90 patients with advanced laryngeal carcinoma. The Control group was 10 normal larynx mucosa specimens. The presence of HPV was investigated polyclonally by polymerase chain reaction, and protein16 with immunohistochemical method. In HPV positive cases, the presence of HPV types 16, 18 were evaluated by polymerase chain reaction. Demographic features of patients were noted. Patient survival and association with HPV/protein16 was determined.

DOI se refere ao artigo: <https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2019.11.005>

☆ Como citar este artigo: Dogantemur S, Ozdemir S, Uguz A, Surmelioglu O, Dagkiran M, Tarkan O, et al. Assessment of HPV 16, HPV 18, p16 expression in advanced stage laryngeal cancer patients and prognostic significance. Braz J Otorhinolaryngol. 2020;86:351–7.

☆☆ Este artigo foi apresentado como um pôster no 6º Congresso Mundial da IFHNOS; 1 a 4 de setembro de 2018; Buenos Aires, Argentina.

\* Autor para correspondência.

E-mail: [drsozdemir@gmail.com](mailto:drsozdemir@gmail.com) (S. Ozdemir).

A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

**Results:** Polyclonal HPV positivity was detected in 11 (12.2%) of 90 cases. Out of these 11 cases, HPV 16 was positive in 6, HPV 18 in 4, and both HPV 16 and 18 were positive in 1. In 18 (20%) of the cases, p16 was positive. Six of the cases (6.6%) had both HPV and protein16 positivity. In cases where protein16 alone or HPV and protein16 were co-positive, alcohol use was less and the tumor was found more likely to be localized in the supraglottic area. These ratios were statistically significant. Supraglottic localization of tumor was determined to be increased in protein16 positive cases. The correlation between protein16 positivity and supraglottic area location was determined to be statistically significant ( $p=0.011$ ). 55.6% of protein16 positive cases was located in the supraglottic region, 33.3% was glottic and 11.1% was transglottic. Although life expectancy over 5 years were numerically higher in HPV and protein16 positive cases, this was not found to be statistically significant. There was no statistically significant relationship between HPV positivity and mean age, differentiation, smoking and alcohol use, tumor progression, lymph node metastasis, localization, recurrence, cause of mortality and treatment methods in our study. The mean follow-up period of our patients was 6.7 years.

**Conclusion:** The close relationship between HPV and oropharyngeal squamous cell carcinoma could not be shown in larynx malignancy in many studies, including our study. Our findings support a limited role of HPV in laryngeal carcinogenesis. Protein16 is not a reliable surrogate for HPV status in laryngeal cancers and is not a predictor of laryngeal cancer survival. Supraglottic localization of tumor was determined to be increased in protein16 positive cases. The correlation between protein16 positivity and supraglottic area location was determined to be statistically significant. There is a need for more populated clinical trials, where neoplastic proliferation is better demonstrated and the accuracy of the results obtained is supported by different techniques.

© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## PALAVRAS-CHAVE

Laringe;  
Carcinoma  
espinocelular;  
HPV;  
p16;  
Álcool

## Avaliação da expressão do HPV 16, HPV 18, e p16 em pacientes com câncer de laringe em estágio avançado e significado prognóstico

### Resumo

**Introdução:** O papilomavírus humano é um fator de risco etiológico para um subconjunto de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Tem sido demonstrado que o HPV é um poderoso biomarcador prognóstico para o câncer de orofaringe, mas seu papel na laringe ainda não foi explorado em profundidade. Os mecanismos de desenvolvimento dos carcinomas de laringe são bastante complexos e controlados por vários fatores. Tabagismo e álcool são os fatores de risco mais importantes. Estudos recentes indicam que a infecção pelo HPV também desempenha um papel importante nos carcinomas da laringe. Os carcinomas laríngeos relacionados ao HPV ocorrem especialmente na região supraglótica.

**Objetivo:** Nosso objetivo foi determinar a frequência da positividade para o HPV / proteína 16 em pacientes com carcinoma da laringe e a associação da positividade para o HPV e /ou proteína 16 com variáveis como idade, sexo, tabagismo, localização do tumor, metástase linfonodal, recidiva e sobrevivência de carcinoma da laringe em estágio avançado em nosso estudo.

**Método:** Este estudo retrospectivo incluiu 90 pacientes com carcinoma laríngeo avançado. O grupo controle incluiu 10 amostras de mucosa laríngea normal. A presença de HPV foi investigada por anticorpo policlonal através de reação de polimerase em cadeia e a proteína 16 por método imunohistoquímico. Nos casos positivos para o HPV, a presença dos tipos 16 e 18 do foi avaliada por reação de polimerase em cadeia. As características demográficas dos pacientes foram observadas. A sobrevivência dos pacientes e a associação com HPV / proteína 16 foram determinadas.

**Resultados:** A positividade com anticorpo policlonal do HPV foi detectada em 11 (12,2%) dos 90 casos. Desses 11 casos, o HPV 16 foi positivo em 6, o HPV 18 em 4 e o HPV 16 e 18 foram positivos em 1. Em 18 (20%) dos casos, a proteína 16 foi positiva. Seis dos casos (6,6%) apresentaram positividade para HPV e proteína 16. Nos casos positivos apenas para a proteína 16 ou quando HPV e a proteína 16 foram co-positivos, a ingestão de álcool foi menor e o tumor apresentou maior probabilidade de estar localizado na área supraglótica. Essas proporções foram estatisticamente significantes. A localização supraglótica do tumor foi maior em casos positivos para proteína 16. A correlação entre positividade para proteína 16 e localização da área supraglótica foi estatisticamente significativa ( $p=0,011$ ). Dos casos positivos para proteína 16, 55,6% foram

supraglóticos, 33,3% glóticos e 11,1% transglóticos. Embora a expectativa de vida acima de 5 anos tenha sido numericamente maior nos casos positivos para HPV e proteína 16, isso não foi estatisticamente significativo. Não houve relação estatisticamente significativa entre positividade do HPV e média de idade, diferenciação, tabagismo e uso de álcool, progressão tumoral, metástase linfonodal, localização, recidiva, causa de mortalidade e métodos de tratamento em nosso estudo. O período médio de seguimento de nossos pacientes foi de 6,7 anos.

**Conclusão:** A estreita relação entre HPV e carcinoma espinocelular orofaríngeo não pôde ser demonstrada na laringe em muitos estudos, inclusive no nosso estudo. Nossos achados confirmam um papel limitado do HPV na carcinogênese da laringe. A proteína 16 não é um substituto confiável para o status do HPV nos cânceres de laringe e não é preditor da sobrevida do câncer de laringe. A localização supraglótica do tumor foi maior em casos positivos para proteína 16. A correlação entre positividade para proteína 16 e localização na área supraglótica foi determinada como estatisticamente significativa. Há necessidade de ensaios clínicos com amostras maiores, nos quais a proliferação neoplásica seja melhor demonstrada e a precisão dos resultados obtidos seja apoiada por diferentes técnicas.

© 2019 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Introdução

O câncer de laringe compreende mais de 3% de todos os tumores malignos e foi determinado como o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo.<sup>1</sup> Aproximadamente 151.000 novos diagnósticos e 90.000 mortes são relatadas anualmente devido ao câncer de laringe.<sup>2</sup> Mais de 95% dos casos de câncer de laringe são carcinomas espinocelulares.<sup>1</sup> Os fatores mais efetivos na sobrevida e recidiva da doença são idade, estágio do tumor e comprometimento de linfonodos; entretanto, nos últimos anos, fatores etiológicos têm mostrado sua importância no desenvolvimento e prognóstico do tumor.<sup>3</sup> Como na maioria dos casos de câncer de cabeça e pescoço, os fatores de risco mais importantes no desenvolvimento desses tumores são o tabagismo e o abuso de álcool.<sup>4</sup> Estudos recentes demonstram que o papilomavírus humano (HPV, *Human Papillomavirus*) também pode ter um papel na etiologia do carcinoma espinocelular (CEC) da laringe.<sup>5-8</sup> Foi relatado que a prevalência do HPV no carcinoma espinocelular da laringe varia entre 20% e 30% nas metanálises.<sup>9,10</sup> O tipo de HPV mais frequentemente isolado nos cânceres de laringe é o tipo 16, seguido pelo HPV 18.<sup>9,11</sup> A proteína 16 (p16) é um importante gene supressor no mecanismo de controle do ciclo celular. Normalmente, p16 está presente em níveis muito baixos nas células sem displasia e não pode ser determinada com métodos imuno-histoquímicos.<sup>12</sup> Devido à atividade transformadora do oncogene E7 em todos os tipos de HPV de alto risco, a p16 mostra forte superexpressão nas células cervicais displásicas e isso pode ser facilmente demonstrado por métodos imuno-histoquímicos.<sup>13</sup> Conjuntamente, a alta expressão de p16 e a positividade do HPV mostram alta correlação como indicadores de infecção.<sup>14</sup> O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito das infecções por HPV tipos 16 e 18 e a expressão de p16 em pacientes com câncer de laringe em estágio avançado e sua contribuição prognóstica.

## Método

Noventa pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular da laringe em estágio avançado no Departamento de Otorrinolaringologia da Cukurova University School of Medicine entre janeiro de 2006 e dezembro de 2011,

que não tinham recebido tratamento antes, foram incluídos no estudo. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética institucional da Universidade Cukurova (número de aprovação: 20/48/2015). Casos com câncer de laringe em estágio inicial, casos que foram diagnosticados e tratados anteriormente e casos que não puderam ser acompanhados regularmente foram excluídos do estudo.

## Avaliação imuno-histoquímica para p16

Tecidos de biópsia embebidos em parafina e fixados em formaldeído foram usados com o método de coloração imuno-histoquímica para p16 e 10 tecidos laríngeos normais foram usados no grupo controle. Os tecidos fixados em formaldeído a 10% foram colocadas em blocos para processo de avaliação tecidual e as amostras foram preparadas em cortes transversais seriais de 5 microns e coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE). Elas foram examinadas em um microscópio óptico. Os cortes histológicos foram transferidos para lâminas de polilissina específicas para a coloração imuno-histoquímica. Para a reação de polimerase em cadeia (PCR, *Polymerase Chain Reaction*) foram amostrados 5 a 10 cortes de 5 µ. Para os casos retirados do grupo de estudo, p16 (Ventana, 760-500) foi aplicado aos cortes transversais preparados a partir de blocos de parafina com o método da estreptavidina-biotina-peroxidase. A mucosa normal da laringe foi usada para todos os anticorpos como controle positivo. As amostras preparadas foram avaliadas em microscópio óptico.

## Tipologia do HPV

Primeiramente, foram feitos estudos policlonais do HPV e, em seguida, estudos do HPV 16 e 18 nos cortes transversais dos casos preparados a partir de blocos de parafina. Os tipos gerais de HPV 16 e 18 foram estudados com o método de PCR.

## Análise estatística

O *software* IBM SPSS Statistics Versão 20.0 foi usado na análise estatística dos casos. As medidas categóricas foram resumidas em número e porcentagem e as medidas numéricas como média e desvio-padrão. As estatísticas do teste do

qui-quadrado foram usadas na comparação de medidas categóricas entre os grupos. O teste *t* independente foi usado na comparação de medidas numéricas entre os grupos. O teste de McNemar foi usado para examinar a concordância entre HPV e P16. O nível estatisticamente significativo foi estabelecido como 0,05 em todos os testes.<sup>15</sup>

## Resultados

Dos casos, 84 (93,3%) eram do sexo masculino e 6 (6,7%) do feminino. A média de idade foi de 59,9 + 10,8 (26–83) e 46 dos casos eram bem diferenciados (51,1%), 28 (31,1%) moderadamente diferenciados e 16 (17,8%) pouco diferenciados. Dos tumores, 44 (48,9%) apresentavam localização glótica, 24 (26,7%) supraglótica e 22 (24,4%) transglótica. Foram acompanhados 60 casos (66,7%) com classificação T3 e 30 casos (33,3%) com classificação T4. A metástase linfonodal (LN) foi determinada em 29 (32,2%) pacientes. Enquanto todos os pacientes incluídos no estudo tinham histórico de tabagismo, 52 casos (57,8%) foram identificados como usuários regulares de álcool. Determinou-se que 27 casos (30%) apresentaram recidiva, enquanto nenhuma recidiva foi identificada em 63 casos (70%). Nove casos (10%) foram submetidos apenas a cirurgia como tratamento primário, enquanto 40 (44,4%) foram submetidos a radiação adjuvante pós-operatória, 28 (31,1%) a quimiorradioterapia adjuvante pós-operatória e 13 (14,4%) a quimiorradioterapia apenas, sem cirurgia. O período médio de seguimento foi de 6,7 anos em nossos pacientes. Dos casos, 53 (58,9%) tiveram sobrevida acima de 5 anos e 37 (41,1%) 5 anos ou menos. Dos 37 pacientes que foram a óbito, 21 (56,8%) foram a óbito devido ao câncer de laringe e 16 (43,2%) morreram por outras razões, como comprometimento cerebrovascular, doença arterial coronariana e pneumonia.

Onze casos (12,2%) apresentaram positividade policlonal do HPV com o método de PCR. O HPV 16 foi positivo em 6 desses 11 casos (54,5%), o HPV 18 foi positivo em 4 (36,4%) e o HPV 16 e 18 foram positivos em um caso (9,1%). O p16, que foi determinado pelo método de coloração imuno-histoquímica, foi positivo em 18 casos (20%) e 6 casos (6,6%) apresentaram positividade para HPV e p16. Foi determinado que a relação entre os resultados do teste para o HPV e o p16 era de não conformidade.

Em nosso estudo, o número de casos com localização supraglótica do tumor foi maior nos casos positivos para p16. A correlação entre a positividade para p16 e localização supraglótica foi estatisticamente significativa ( $p=0,011$ ); 55,6% dos casos positivos para p16 foram supraglóticos, 33,3% glóticos e 11,1% transglóticos. Em casos com positividade para HPV ou p16 isoladamente, ou ambos, a localização do tumor na área supraglótica foi maior. A correlação entre a positividade para HPV ou p16 isoladamente ou ambos e a localização do tumor na área supraglótica foi determinada como estatisticamente significativa ( $p=0,008$ ). Desses casos, 52,2% eram supraglóticos, 34,8% glóticos e 13% transglóticos. O consumo de álcool foi determinado como menor nos casos positivos para p16. A correlação entre positividade para p16 e de consumo álcool foi estatisticamente significativa ( $p=0,004$ ). Dos casos positivos para p16, 72,2% não consumiam álcool e 27,8% consumiam. Também foi determinado que o consumo de álcool era menor nos casos positivos para HPV e p16. A correlação entre positividade para HPV e p16 e consumo de álcool foi estatisticamente

significante ( $p=0,009$ ). Dos casos positivos para HPV e p16, 64,7% não consumiam álcool, enquanto 33,3% consumiam.

Não foi determinada relação estatisticamente significativa entre positividade para HPV e p16 e média de idade, diferenciação, tabagismo, estágio, metástase de LN, recidiva, causa de morte e métodos de tratamento (tabela 1).

A sobrevida em cinco anos dos casos de CEC da laringe em estágio avançado em nosso estudo foi de 57,8%. Enquanto a sobrevida em cinco anos dos casos positivos para o HPV foi de 63,6%, essa taxa foi de 57% nos casos negativos para o HPV. A sobrevida em cinco anos dos casos positivos para p16 foi de 72,2%, enquanto foi de 54,2% nos casos negativos para p16. Embora a sobrevida em 5 anos tenha sido maior nos casos positivos para HPV e/ou p16, esse valor não foi estatisticamente significativo (fig. 1).

## Discussão

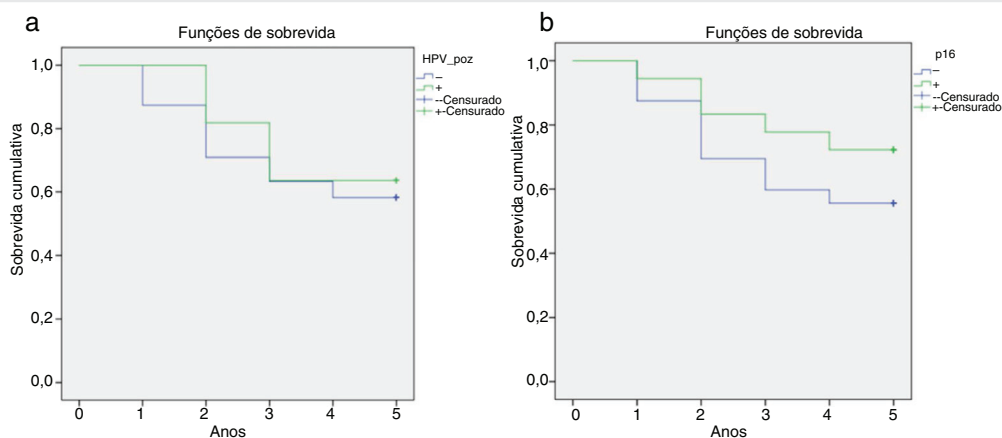
Tabagismo e consumo de álcool são fatores de risco fundamentais para a etiologia do CEC de laringe. O HPV é um fator de risco independente do consumo de tabaco e álcool. Existem estudos que mostram aumento da incidência de HPV em pacientes que não fazem consumo de cigarro e álcool.<sup>16,17</sup> Foi relatado que a taxa de detecção de HPV nos casos de CEC de laringe está dentro da ampla faixa de 0% a 85% nos estudos feitos.<sup>8,18,19</sup> O motivo dessa ampla variação é a seleção de pacientes, diferenças geográficas, uso de álcool e tabagismo, localização do tumor e diferenças nos testes diagnósticos do HPV. Na metanálise feita por Li et al., a infecção pelo HPV foi determinada em 28% dos casos e uma forte correlação foi detectada entre o HPV e o CEC de laringe.<sup>19</sup> Foi demonstrado em estudos clínicos que o HPV desempenha um papel significativo, particularmente na patogênese do CEC de laringe por HPV-16.<sup>20</sup> A positividade para o HPV foi determinada em 5% na Alemanha, 4% na França e 23% nos EUA.<sup>20</sup> Onze (12,2%) de 90 pacientes em nosso estudo eram positivos para HPV. Seis dos casos positivos para o HPV (54,5%) foram considerados positivos para p16.

Em um estudo feito por Ndiaye et al., 649 (22,1%) de 2.739 casos de CEC de laringe apresentaram positividade para o HPV.<sup>21</sup> Nenhuma relação significativa foi determinada entre a prevalência de HPV, consumo de álcool e sexo no mesmo estudo. Foi demonstrado que a positividade para o HPV era maior em pessoas que não eram tabagistas e não consumiam álcool; no entanto, isso não foi estatisticamente significativo. Em relação à localização do tumor, 30% dos casos positivos para HPV eram supraglóticos e 34% glóticos. Em um estudo, 33 dos 674 casos de CEC de laringe (4,9%) apresentaram positividade para o HPV.<sup>16</sup> A positividade para o HPV foi estatisticamente maior em pessoas que não usavam cigarro e álcool e pessoas com massas na área supraglótica. Da mesma forma, foi determinado em nosso estudo que a positividade para o HPV era maior em pessoas que não faziam uso de cigarro e álcool e pessoas com tumores na área supraglótica. Além disso, a positividade para o HPV e p16 foi estatisticamente significativa em relação ao consumo de álcool e localização do tumor (localização supraglótica).

Embora os casos positivos para o HPV na área da orofaringe tenham apresentado um prognóstico significativamente melhor em comparação aos negativos para o HPV na maioria dos estudos, isso não foi comprovado nos casos de câncer de cabeça e pescoço não orofaríngeos (CEC-NO).<sup>17,22</sup> No estudo feito por Duray et al.,

**Tabela 1** Associação entre positividade para HPV e a proteína 16 e parâmetros clínicos

	Ambos positivos	Apenas um positivo	Ambos negativos	p
<i>Idade</i>	58,83 (12,281)	57,41 (10,063)	60,70 (10,909)	0,520
<i>Diferenciação</i>				0,840
Bem diferenciado	2 (33,3%)	8 (47,1%)	36 (53,7%)	
Moderadamente diferenciado	2 (33,3%)	6 (35,3%)	20 (29,9%)	
Mal diferenciado	2 (33,3%)	3 (17,6%)	11 (16,4%)	
<i>Localização</i>				0,027
Glótico	3 (50,0%)	5 (29,4%)	36 (53,7%)	
Supraglótico	2 (33,3%)	10 (58,8%)	12 (17,9%)	
Transglótico	1 (16,6%)	2 (11,8%)	19 (28,4%)	
<i>Estágio</i>				0,468
T3	3 (50,0%)	13 (76,5%)	44 (65,7%)	
T4	3 (50,0%)	4 (23,5%)	23 (34,3%)	
<i>Metástase de linfonodo</i>				0,589
Positiva	3 (50,0%)	6 (35,3%)	20 (29,9%)	
Negativa	3 (50,0%)	11 (64,7%)	47 (70,1%)	
<i>Uso de cigarros (maços/ano)</i>	57,50 (23,187)	41,47 (14,975)	49,03 (17,061)	0,105
<i>Uso de álcool</i>				0,009
Com uso	2 (33,3%)	5 (29,4%)	45 (67,2%)	
Sem uso	4 (64,7%)	12 (70,6%)	22 (22,8%)	
<i>Tratamento</i>				0,687
Cirurgia	0 (0,0%)	3 (17,6%)	6 (9,0%)	
Cirurgia+Radioterapia	2 (33,3%)	8 (47,1%)	30 (44,8%)	
Cirurgia+Quimiorradioterapia	2 (33,3%)	4 (23,5%)	22 (32,8%)	
Quimiorradioterapia	2 (33,3%)	2 (11,8%)	9 (13,4%)	
<i>Recidiva</i>				0,291
+	3 (50,0%)	3 (17,6%)	21 (31,3%)	
-	3 (50,0%)	14 (82,4%)	46 (68,7%)	
<i>Causa da morte</i>				0,128
Cancer de laringe	1 (33,3%)	3 (100,0%)	17 (54,8%)	
Outra	2 (66,7%)	0 (0,0%)	14 (45,2%)	

**Figura 1** Correlação entre positividade para HPV (a) e a proteína p16 (b) e sobrevida em 5 anos.

nenhuma diferença significativa foi relatada nos casos HPV positivos e negativos para CEC de laringe em relação ao tabagismo, idade, estágio, diferenciação, recidiva e sobrevida. Diferentemente de outros estudos, os casos de CEC de laringe em estágio IV demonstraram ter maior positividade para o HPV em comparação com os casos em estágio I e II no mesmo estudo.<sup>23</sup> Um estudo similar de Meshman et al. mostrou que a expressão de p16 e a presença de HPV nos carcinomas da laringe e hipofaringe não têm correlação com a sobrevida global e o controle locorregional.<sup>24</sup> Em nosso estudo, nenhuma relação estatisticamente significativa foi

determinada entre a positividade para o HPV e p16 e média de idade, diferenciação, tabagismo, estágio, metástase de LN, recidiva, causa de morte e métodos de tratamento.

Morshad et al. fizeram um dos maiores estudos sobre câncer de laringe associado ao HPV. Neste estudo, nenhuma diferença significativa foi determinada em relação à sobrevida entre pacientes positivos e negativos para o HPV no seguimento de 3 e 5 anos após o diagnóstico.<sup>25</sup> O seguimento médio dos casos em nosso estudo foi de 6,7 anos. A taxa de sobrevida em cinco anos foi de 57,8% e essa taxa foi de 63,6% nos casos positivos para HPV e 57% nos casos negativos.



A taxa de positividade para p16 nos casos de câncer de laringe varia de 1% a 58% na literatura. No estudo feito por Xu et al., 51 de 674 casos de CEC de laringe (7,57%) mostraram positividade para p16, enquanto Chung et al. obtiveram uma taxa de positividade para p16 em 11 dos 140 casos de CEC de laringe (7,8%) e Kanyılmaz et al. relataram positividade para p16 em 58 (44%) dos 131 casos de CEC de laringe.<sup>16,26,27</sup> Em nosso estudo, 18 de 90 pacientes (20%) eram positivos para p16.

Estudos mostram que o consumo de cigarro e álcool é menor nos casos positivos para p16.<sup>16,17,27</sup> No estudo feito por David et al., 6 dos 8 casos de não fumantes eram positivos para p16 e isso foi avaliado como estatisticamente significativo.<sup>28</sup> No mesmo estudo, afirmou-se que o p16 pode ser um indicador imuno-histoquímico adequado em casos de câncer de laringe em não fumantes. Em nosso estudo, 13 dos 18 casos (72,2%) que foram considerados positivos para p16 não consumiam álcool. Este resultado mostrou ser estatisticamente significativo. Todos os pacientes positivos para p16 eram fumantes.

Há vários estudos na literatura sobre a positividade para p16 e localização do tumor. Xu et al. relataram que a positividade para p16 foi significativamente maior nos casos supraglóticos em seu estudo.<sup>16</sup> Embora essa relação tenha sido determinada em outros estudos, não foi possível demonstrar uma diferença significativa.<sup>27-29</sup> Dez (55,6%) de 18 casos positivos para p16 em nosso estudo apresentava localização supraglótica e esse valor foi estatisticamente significativo.

Enquanto alguns autores associaram a presença de p16 no CEC de laringe a um bom prognóstico, a negatividade para o p16 foi associada a um mau prognóstico e recidiva.<sup>26,27,30</sup> Geisler et al., em estudo que incluiu 190 pacientes com CEC de laringe, relataram que a presença de p53 mostrou correlação com mau prognóstico, enquanto a expressão de p16 não esteve associada ao prognóstico.<sup>31</sup> Em nosso estudo, a taxa de sobrevida em 5 anos dos casos negativos para p16 foi de 54,2%, enquanto a taxa de sobrevida em 5 anos dos casos positivos foi de 72,2%. Embora a sobrevida dos casos positivos para p16 tenha sido melhor, não foi estatisticamente significativa.

No estudo feito na presença de recidiva por David et al., 8 de 58 casos de CEC de laringe (13,8%) apresentaram recidiva três anos após o diagnóstico. Foi reportado que todos os casos recorrentes apresentavam negatividade para p16.<sup>28</sup> Em outro estudo, enquanto a positividade para p16 mostrou prognóstico significativamente bom no carcinoma espinocelular (CEC) orofaríngeo, essa significância não foi demonstrada no CEC de laringe.<sup>17</sup> Em nosso estudo, 5 dos 18 casos positivos para p16 (27,8%) apresentaram recidiva em 5 anos. A relação entre positividade para p16 e recidiva não foi estatisticamente significativa.

Embora tenha sido demonstrada uma relação entre a positividade para p16 no CEC orofaríngeo e o baixo estágio T e metástase de linfonodo (LN), essa relação não pôde ser demonstrada nos casos de CEC de laringe.<sup>32</sup> Uma relação significativa foi determinada entre p16, sexo feminino e presença de metástase de LN, mas nenhuma relação significativa foi encontrada com outras características clínicas e demográficas no estudo de Young et al.<sup>29</sup> Em nosso estudo, 8 dos 18 casos positivos para p16 (44,4%) mostraram metás-

tase de LN, mas esse resultado não foi estatisticamente significativo. Também não foi determinada relação entre positividade para p16, gênero e diferenciação do tumor.

A positividade para p16 é um indicador importante no diagnóstico da infecção pelo HPV. Em métodos mais avançados e sensíveis, resultados diferentes podem ser demonstrados na correlação do HPV-p16. Em um estudo, o HPV era positivo em 33 dos 674 casos de CEC de laringe, enquanto o p16 foi positivo em 51. Todos os casos positivos para o HPV também foram positivos para p16 e a sensibilidade para p16 foi de 100% e a especificidade para p16 foi de 65%.<sup>16</sup> Esses resultados são semelhantes aos do estudo de Smeets et al. (sensibilidade para p16 de 100%, especificidade para p16 de 79%).<sup>33</sup> Em nossos resultados, p16 foi positivo em 6 de 11 casos positivos para HPV. A sensibilidade para p16 foi de 54,5% e a especificidade para p16 foi de 84,8%. Nenhuma correlação estatisticamente significativa foi determinada entre p16 e HPV.

Embora tenha sido demonstrado que a positividade para HPV e p16 proporcionou um melhor prognóstico no CEC orofaríngeo, nenhum resultado significativo pode ser obtido em relação às causas de CEC da laringe, devido ao baixo número de casos positivos para HPV e p16.<sup>34</sup> A positividade para p16 e HPV mostra prognóstico significativamente melhor no CEC-NO. No estudo feito por Lewis et al., demonstrou-se que não houve relação significativa entre os casos de HPV(-)/p16 (+) e casos de HPV(+)/p16 (+), que esses casos apresentaram melhor prognóstico em comparação ao HPV(-) / p16 (-) e que essa expressão de p16 pode ser um indicador de bom prognóstico.<sup>35</sup> Observamos que os casos positivos para HPV e p16 apresentaram menor recidiva e sobrevida mais longa, mas isso não foi estatisticamente significativo.

## Conclusão

Atualmente, a opinião aceita para oncogênese é que deve haver uma interação recíproca entre diferentes fatores moleculares para a formação do tumor. Esses fatores são os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e alguns oncogenes virais que regulam a proliferação, apoptose e diferenciação celular. Entretanto, devido a vários fatores como o tipo de célula, ambiente celular e antecedentes genéticos, é difícil estimar o processo de progresso após o início da atividade de carcinogênese.

A estreita relação entre HPV e CEC orofaríngeo não pôde ser demonstrada na laringe em muitos estudos, inclusive o nosso. Nossos achados confirmam que p16 não é um substituto confiável para o status do HPV no câncer de laringe e não é um preditor de sobrevida no câncer de laringe. Observou-se que a localização supraglótica do tumor foi maior em casos positivos para p16. A correlação entre positividade para p16 e localização na área supraglótica foi determinada como estatisticamente significativa. Maiores estudos sobre a positividade para HPV e p16 no câncer de laringe serão mais úteis para o tratamento, acompanhamento e prognóstico dos pacientes.

## Financiamento

Fundo de Projetos de Pesquisa Científica da Cukurova University.

## Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

1. Beasley NJP, Gullance PJ. Cancer of the larynx, paranasal sinuses and temporal bone. Chapter 27: Essential Otolaryngology. Ed: KJ Lee. Med J. 2003.
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin*. 2009;59:225–49.
3. Brandstorp-Boesen J, Sørnum Falk R, Boysen M, Brøndbo K. Impact of stage, management and recurrence on survival rates in laryngeal cancer. *PLoS One*. 2017;14(12), e0179371.
4. Talamini R, Bosetti C, La Vecchia C, Dal Maso L, Levi F, Bidoli E, et al. Combined effect of tobacco and alcohol on laryngeal cancer risk: a case-control study. *Cancer Causes Control*. 2002;13:957–64.
5. Moore CE, Wiatrak BJ, McClatchey KD, Koopmann CF, Thomas GR, Bradford CR, et al. High-risk human papillomavirus types and squamous cell carcinoma in patients with respiratory papillomas. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;120:698–705.
6. de Oliveira DE, Bacchi MM, Macarenco 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;126:284–93.
7. Mürger K, Baldwin A, Edwards EM, Hayakawa H. Mechanisms of human papillomavirus induced oncogenesis. *J Virol*. 2004;78:11451–60.
8. Halec G, Holzinger D, Schmitt M, Flechtenmacher C, Dyckhoff G, Lloveras B, et al. Biological evidence for a causal role of HPV16 in a small fraction of laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2013;109:172–83.
9. Isayeva T, Li Y, Maswahu D, Brandwein-Gensler M. Human papillomavirus in non-opharyngeal head and neck cancers: a systematic literature review. *Head Neck Pathol*. 2012;6 suppl 1:S104–20.
10. Gama RR, Carvalho AL, Longatto Filho A, Scorsato AP, López RV, Rautava J, et al. Detection of human papillomavirus in laryngeal squamous cell carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Laryngoscope*. 2016;126:885–93.
11. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:467–75.
12. Young RJ, Urban D, Angel C, Corry J, Lyons B, Vallance N, et al. Frequency and prognostic significance of p16<sup>INK4A</sup> protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2015;112:1098–104.
13. Alberts B, Jhonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4<sup>th</sup> ed. New York: Taylor and Francis Group. *Fam Cancer*; 2002. p. 1313–62.
14. Langendijk JA, Psyrri A. The prognostic significance of p16 overexpression in oropharyngeal squamous cell carcinoma: implications for treatment strategies and future clinical studies. *Ann Oncol*. 2010;21:1931–4.
15. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Released 2011. Armonk, NY: IBM Corp.
16. Xu Y, Liu S, Yi H, Wang J, Dong P, Li X, et al. Human Papillomavirus Infection in 674 Chinese Patients with Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Plos One*. 2014;9:e115914.
17. Salazar CR, Anayannis N, Smith RV, Wang Y, Haigentz M Jr, Garg M, et al. Combined p16 and human papillomavirus testing predicts head and neck cancer survival. *Int J Cancer. Head Neck Pathol*. 2014;8:77–87.
18. Saheb JM, Boorghani M, Ghaffari SR, Atarbashi MF, Keyhani A. Human papillomavirus in saliva of patients with oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14:525–8.
19. Li X, Gao L, Li H, Gao J, Yang Y, Zhou F, et al. Human Papillomavirus Infection and Laryngeal Cancer risk: a systemic review and meta-analysis. *J infect Dis*. 2013;207:479–88.
20. Dyannai F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol*. 2010;2:15.
21. Ndiaye C, Mena M, Alemany L. Correction to *Lancet Oncol* 2014; 15: 1324. HPV DNA, E6/E7 mRNA and p16INK4A detection in head and neck cancers: a systemic review and meta-analysis. *Lancet Oncol*. 2015;16:e262.
22. Sethi S, Ali-Fehmi R, Franceschi S, Struijk L, van Doorn LJ, Quint W, et al. Characteristics and survival of head and neck cancer by HPV status: a cancer registry-based study. *Int J Cancer*. 2012;131:1179–86.
23. Duray A, Descamps G, Arafa M, Decaestecker C, Rummelink M, Sirtaine N, et al. High incidence of high-risk HPV in benign and malignant lesions of the larynx. *Int J Oncol*. 2011;39:51–9.
24. Meshman J, Wang PC, Chin R, John MS, Abemayor E, Bhuta S, Chen AM. Prognostic significance of p16 in squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Am J Otolaryngol*. 2017;38:31–7.
25. Morshad K. Association between human papillomavirus infection and laryngeal squamous cell carcinoma. *J Med Virol*. 2010;82:1017–23.
26. Chung CH, Zhang Q, Kong CS, Harris J, Fertig EJ, Harari PM, et al. p16 protein expression and human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2014;32:3930–8.
27. Kanyılmaz G, Ekinci O, Muge A, Celik S, Ozturk F. HPV-Associated p16<sup>INK4A</sup> Expression and response to therapy and survival in selected head and neck cancers. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16:253–8.
28. David K, Celakovsky P, Laco J, Ludvikova M. The role of Protein p16<sup>INK4A</sup> in glottic laryngeal squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res*. 2014;20:909–15.
29. Young RJ, Urban D, Angel C, Corry J, Lyons B, Vallance N, et al. Frequency and prognostic significance of p16<sup>INK4A</sup> protein overexpression and transcriptionally active human papillomavirus infection in laryngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2015;112:1098–104.
30. Wittekindt C, Gültekin E, Weissenborn SJ, Dienes HP, Pfister HJ, Klussmann JP. Expression of p16 protein is associated with human papillomavirus status and has implications on survival. *Adv Otorhinolaryngol*. 2005;62:72–80.
31. Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, Cai J, Funkhouser WK, Smith J, et al. p16 and p53 expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2002;8:3445–53.
32. Lundberg M, Renkonen S, Haglund C, Mattila PS, Leivo I, Hagström J, et al. Association of BMI-1 and p16 as prognostic factors for head and neck carcinomas. *Acta Otolaryngol*. 2016;136:501–5.
33. 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;121:2465–72.
34. Ang KK, Sturgis EM. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol*. 2012;22:128–42.
35. Lewis JS, Jr, Thorstad WL, Chernock RD, Haughey BH, Yip JH, Zhang Q, et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:1088–96.