

Investigación científica y artículos originales



Acta de Otorrinolaringología & Cirugía de Cabeza y Cuello

www.revista.acorl.org.co



Investigación científica y artículos originales

Significado pronóstico de la proteína p16 en el cáncer laríngeo Prognostic significance of p16 protein levels in laryngeal cancer

Elena Sánchez-Legaza, Rosario Guerrero Cauqui*, José Alfonso Miranda Caravallo**,
Jesús Dávila Guerrero***

* Servicio de Anatomía Patológica.

** Servicio de Anestesia.

*** Servicio de Medicina Preventiva.

Servicio de ORL, Hospital del SAS de Algeciras, Cádiz, España.

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido: Julio 8/2013

Revisado: Agosto 2/2013

Aceptado: Agosto 20/2013

Palabras clave:

p16, inmunohistoquímica, cáncer de cabeza y cuello, papilomavirus

RESUMEN

Introducción: El tabaco y el alcohol son los dos principales factores etiológicos del cáncer laríngeo, y el VPH es un coadyuvante de los anteriores.

La positividad del p16 y, por tanto, la detección del VPH, se localiza preferentemente en la orofaringe. En los pacientes con carcinoma orofaríngeo uniformemente tratados con quimio-radioterapia, la presencia del VPH es un indicador pronóstico favorable con respecto a la recurrencia y la supervivencia global. El objetivo consiste en extrapolar estos resultados al cáncer de laringe, tras ver similitudes del mismo con el VPH.

Método: Se estudian varias variables clinicopatológicas: edad, tabaquismo, alcoholismo, histología, estadios de la afección y localización en 95 pacientes con cáncer de laringe. Estas variables se correlacionaron con la tinción inmunohistoquímica de p16.

Resultados: El VPH es positivo en el 20% de cáncer laríngeo, sobre todo en los estadios III y IV, y a nivel supraglótico y transglótico, pero no pueden obtenerse resultados significativos, pues el test exacto de F para ambas variables, estadio y localización, es 0,482 y 1,073.

Conclusiones: El VPH está presente en el 20% del cáncer epidermoide laríngeo, sin mostrar preferencia a nivel de localización ni estadio, en pacientes fumadores, susceptibles de aplicar protocolos de preservación de órgano.

Correspondencia:
Hospital del SAS de Algeciras, Cádiz, España
manpro1910@hotmail.com

ABSTRACT

Key words:

p16, immunohistochemistry, head and neck cancer, human papillomavirus

Introduction: Tobacco and alcohol are the two major etiological factors for laryngeal cancer, and HPV is an adjunct of both of them.

P16 positivity and therefore HPV detection is preferably located at the oropharynx. In patients with oropharyngeal carcinoma uniformly treated with chemo-radiotherapy, the presence of HPV is a favourable prognostic indicator regarding recurrence and overall survival. Our aim is to extrapolate these results to cancer of the larynx after seeing similarities with HPV.

Method: We study several clinical and pathological variables: age, smoker, drinker, histology, staging and localization, in 95 patients with laryngeal cancer. These variables were correlated with immunohistochemical staining of p16.

Results: HPV is positive in 20% of epidermoid laryngeal carcinoma. There are no statistically significant differences regarding level (supraglottic or transglottic level) or stages (III and IV). F exact test for both variables, stage and location, are 0,482 and 1,073 respectively.

Conclusions: HPV is present in 20% of squamous laryngeal cancer. It shows no preference to level, location or stage in smokers susceptible of being applied organ preservation protocols.

Introducción

El cáncer de cabeza y cuello es el sexto en términos de incidencia en la población mundial, con 500.000 nuevos casos anuales, y en España representa entre el 5 al 10% de los tumores malignos, y más del 90% son carcinomas escamosos. Originan el 5% de muertes por cáncer, situándose la tasa de curación en torno al 60%. Esto lleva a la búsqueda de factores etiológicos y biológicos que permitan diagnosticar precozmente y valorar el pronóstico del carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC) (1).

Es conocido que el tabaco es el principal factor etiológico, que el alcohol tiene un papel sinérgico, y que la infección por el virus del papiloma humano (VPH) está ligada a la carcinogénesis de los CECC. De hecho, la IARC (Agencia para la Investigación sobre el Cáncer) lo reconoce como un factor de riesgo para el cáncer de orofaringe (2).

Los principales factores pronósticos de CECC se recogen en la clasificación TNM; sin embargo, son incapaces de predecir la respuesta clínica al tratamiento empleado.

Se han descrito varios marcadores biológicos asociados con la respuesta al tratamiento genotóxico; entre ellos está la infección por el VPH, las mutaciones del gen supresor del tumor p53 y la sobreexpresión del factor de crecimiento epidérmico como marcadores de mala respuesta, aunque esta capacidad no se ha confirmado en estudios independientes (3).

La frecuencia de infección por VPH en CECC se estima en un 25%, entre 20 y 61%, dependiendo de la localización, área geográfica de estudio y métodos utilizados para su detección. Así, la mayor prevalencia ocurre en la orofaringe (40%), sobre todo en amígdala y base de lengua, y menos frecuente en la laringe (24,0%) (4). El genotipo predominante en CECC de orofaringe es el VPH-16 (90 al 95%) y 69%

para los laríngeos, y es considerado un marcador etiológico y pronóstico de los primeros (5).

Los carcinomas asociados al VPH (CECC VPH+) son entidades distintas que actúan bajo la acción de las oncoproteínas E6 y E7, responsables de su transformación maligna y progresión a un estado neoplásico (bloqueando la acción de p53 y pRB), y a diferencia de los carcinógenos, como el tabaco y el alcohol, el virus no interrumpe el código genético (5). Hasta el 50% de CECC con VPH+ presentan E6/E7 mRNA o VPH transcripcionalmente activo (VPH con capacidad oncogénica), más frecuente en los CECC orofaríngeos, sobre todo amígdala palatina (60%) y base lingual, pues a nivel orofaríngeo las células escamosas son más accesibles al virus. DNA VPH puede ser detectado en todas las etapas de la carcinogénesis, desde displasia hasta carcinoma invasivo (6, 7).

La proteína p16 o ciclina D1 es un regulador supresor del ciclo celular, localizado en el cromosoma 9p21, que es considerado un marcador específico y muy sensible de infección por VPH en CECC (8). La técnica inmunohistoquímica que utiliza la proteína p16 tiene una sensibilidad del 100% y está considerada una buena técnica inicial en la discriminación de muestras VPH+ respecto del VPH- (9).

La sobreexpresión p16 nuclear y citoplásmica es específica de tumores VPH+, considerándose un marcador transcripcionalmente activo de dicha infección, lo que nos ayuda a distinguirlos de otras lesiones, incluidos los tumores VPH-, donde está ausente dicha proteína (10). Así, la pérdida de la expresión de la proteína p16 es un evento común y precoz en CECC relacionado con el tabaco/alcohol.

La positividad del p16 se localiza preferentemente en la orofaringe, al igual que la detección del VPH+, por eso la mayoría de los estudios se han hecho en la orofaringe, y nosotros lo vamos a efectuar en tumores laríngeos, para plantear que el p16/estado VPH es un factor pronóstico a este nivel.

Pacientes y materiales

Se incluyen 95 pacientes diagnosticados con cáncer de laringe durante los últimos cinco años, en distintos estadios, del I al IV, y diferente localización, todos ellos confirmados histológicamente. Las muestras se obtienen tras la exéresis quirúrgica de la pieza o en tomas de biopsia en el hospital de Algeciras, Cádiz. Se han estudiado varias variables: edad, tabaquismo, alcoholismo, histología, tipos de estadio y localización del tumor. Se ha utilizado la sexta edición de la clasificación TNM (UICC, AJCC, 2002) para su ordenamiento y estudio. La recolección de datos y su tratamiento estadístico se realizaron en SPSS 15,0.

La técnica inmunohistoquímica utilizada determina cualitativamente el antígeno p16INK4a en cortes de tejidos de tres milimicras de sección, procedentes de piezas o biopsias de laringe, fijadas con formol e incluidas en parafina. Para la detección del antígeno se emplea un anticuerpo primario de ratón monoclonal, clon E6H4, frente a la proteína humana p16INK4a.

El CINtec * histology kit es el dispositivo usado, basado en el uso de un antígeno primario de ratón monoclonal (clon E6H4) frente a la proteína humana p16INK4a.

La tinción fue nuclear y citoplásmica, y puntuada en tres grados, como sigue: negativa (sin inmunoreactividad), positiva (todos los grupos celulares presentan tinción nuclear y citoplásmica fuerte) y débilmente positiva (grupos celulares aislados o células aisladas con positividad nuclear y citoplásmica leve).

Objetivos/hipótesis

Se hace un estudio descriptivo con los siguientes objetivos:

- La sobreexpresión de p16 puede usarse como un biomarcador para detectar lesiones precancerosas y cancerosas, a fin de diagnosticar la displasia/neoplasia del tumor laríngeo.
- La técnica con p16 es una herramienta útil para distinguir el cáncer relacionado con VPH (VPH+) del cáncer provocado por otras causas y, por tanto, ser el VPH un factor pronóstico (pues los casos positivos para p16 tienen mejor pronóstico que los negativos).

Resultados

El rango de edad de los pacientes fluctúa entre 37 y 86 años, con una edad media de 61 años y una desviación típica de 10,40.

Todos los pacientes eran hombres y fumadores, lo cual demuestra el factor etiológico del tabaco, y el papel sinérgico del alcohol, pues el 80,2% eran bebedores.

Las muestras se obtuvieron por medio de laringectomía total en 66 casos (68,8%) y laringectomía parcial en 13 (13,5%), y en 16 se hicieron tomas de biopsia (17,7%), mediante microcirugía laríngea. La histología presentada por la mayoría de los tumores laríngeos son carcinomas escamosos, salvo dos: uno carcinoma verrucoso y otro pseudosarcoma.

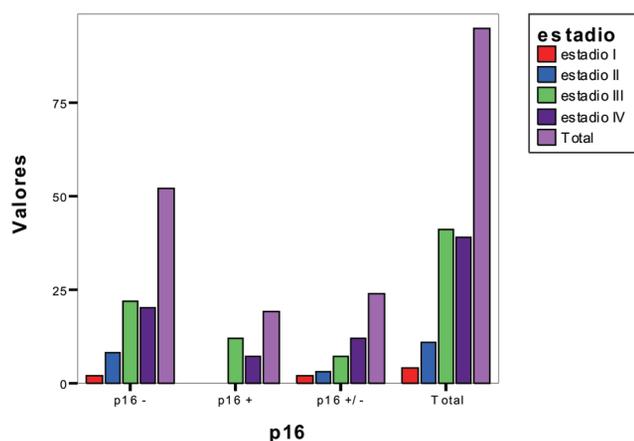
Los resultados tras aplicar la inmunohistoquímica con p16 fue: 19 positivos (20,0%), 24 débilmente positivos (25,3%) y 52 negativos (54,7%).

Los estadios encontrados se observan en la tabla 1, siendo el estadio III (43,2%) y el IV (41,1%) los más frecuentes: 4 casos del I (4,2%), 11 del II (11,6%), 41 del III (43,2%) y 39 del IV (41,1%). Si se aplica la inmunohistoquímica con p16, esta es más frecuente en los estadios III y IV, respectivamente, y no aparecieron casos positivos en los dos primeros estadios.

Tabla 1. p16 * Estadio

	Estadio				Total
	I	II	III	IV	
p16 -	2	8	22	20	52
p16 +	0	0	12	7	19
p16 +/-	2	3	7	12	24
Total	4	11	41	39	95

Tabla de contingencia estadio * p16



Respecto a la variable localización (tabla 2), los resultados serían: la más frecuente es la supraglótica, con 38 casos (40,0%), seguida de la transglótica, 34 (35,8%), y menos frecuentes la glótica, 18 (18,8%), y la laringofaríngea, 8 casos (8,4%). Si se aplica la inmunohistoquímica con p16, resulta positiva en los supraglóticos, seguida de los transglóticos.

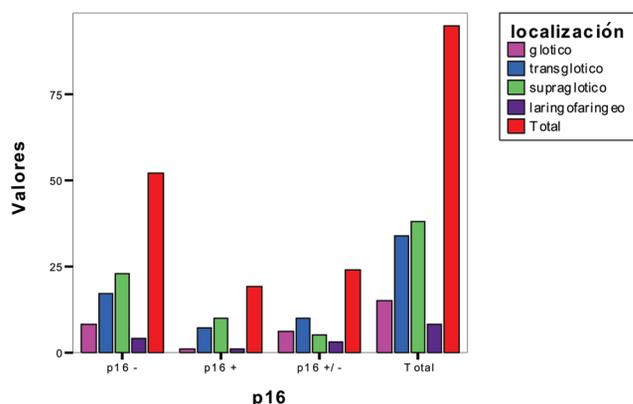
Tabla 2. p16 * Localización

	Localización				Total
	Glótica	Transglótica	Supraglótica	Laringofaríngea	
p16 -	8	17	23	4	52
p16 +	1	7	10	1	19
p16 +/-	6	10	5	3	24
Total	15	34	38	8	95

Se codificaron las variables estadio, localización y p16, para trabajar con variables cuantitativas.

Si comprobamos la igualdad de las varianzas entre ambas variables, localización y estadio, observamos (tablas 3 y 4)

Tabla de contingencia localización * p16



que el test exacto de F para las dos variables, estadio y localización, es mayor que 0,05, 0,482 y 1,073 respectivamente; luego podemos concluir que no existen diferencias entre los grupos estudiados en ambas variables, lo cual indica la similitud de sus poblaciones de origen, debiéndose aumentar el tamaño de la muestra para obtener resultados significativos.

Tabla 3. ANOVA Estadio

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intergrupos	,641	2	,320	,482	,619
Intragrupos	61,149	92	,665		
Total	61,790	94			

Tabla 4. ANOVA Localización

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Intergrupos	1,573	2	,786	1,073	,346
Intragrupos	67,417	92	,733		
Total	68,990	94			

Discusión

El cáncer laríngeo corresponde al 2% de todas las neoplasias en EE. UU. y el norte de Europa, más prevalente en varones desde la sexta hasta la séptima décadas. La mortalidad se estima en el 32%, y la supervivencia en el 70%. El consumo de tabaco y alcohol son los principales factores de riesgo del carcinoma laríngeo (80 al 90%) (11). El 5% del cáncer laríngeo se presenta en no fumadores y no bebedores, quienes tienen mejor pronóstico, lo cual sugiere la implicación de otros factores etiológicos, como la infección por el VPH, que, de hecho, se ha ligado al cáncer laríngeo desde hace más de 20 años, y se postula como un coadyuvante del tabaco/alcohol. En tumores de orofaringe inducidos por el VPH, el tabaco tiene un impacto negativo sobre la recaída y la supervivencia de los pacientes con tumores positivos para el VPH,

pues el riesgo de muerte y recurrencia del cáncer aumentó significativamente en un 1% por cada año adicional por paquete de tabaco; esto indica que el consumo de tabaco puede alterar el comportamiento biológico del tumor VPH+ (12).

La prevalencia de la infección VPH en mucosa normal se estima en 19%, y en cáncer laríngeo, en 25% (13), aunque esto es variable en función del método de diagnóstico empleado, y es inversamente proporcional al tamaño muestral utilizado en el estudio (19 al 58,8%). En nuestra investigación, el VPH está presente en el 20%, y es dudoso en un 25,3%, un porcentaje notable para aplicar conclusiones.

Se ha observado un descenso en la incidencia de CECC relacionados con el consumo de tabaco, al igual que los pacientes fumadores, pero se incrementa la incidencia de CECC con VPH+ (14). En nuestro estudio se sigue demostrando que el tabaco es el principal factor etiológico, pues todos son fumadores.

El estado del VPH del tumor es importante para establecer su clasificación y para determinar su origen (15); así, la detección del VPH y la valoración inmunohistoquímica de la expresión del p16 permite clasificar los tumores CECC en: biológicamente/VPH+ y VPH-. Los CECC positivos para el VPH presentan, además de una menor asociación con el consumo crónico de tabaco y alcohol, otras alteraciones biológicas, moleculares e inmunogenéticas que los diferencian de los CECC negativos para el VPH (16). Suelen darse en pacientes más jóvenes, de ambos sexos, con alta exposición al sexo oral. Esta fuerte correlación entre el estado del VPH+ y pacientes jóvenes con una historia de no fumador y alto número de compañeros sexuales, hace que se considere una enfermedad de transmisión sexual, sin estar ligada al sexo.

Respecto a la histología, la mayoría de los tumores registrados en el estudio son carcinomas escamosos y dos carcinomas muy diferenciados: uno sarcomatoso, que fue débilmente positivo para el p16, y otro verrucoso, que resultó negativo. Los tumores VPH+, que expresan p16, suelen ser pobremente diferenciados con un fenotipo basaloide o no queratinizante (17).

Múltiples estudios han demostrado que el CECC VPH+ es más sensible al tratamiento, tiene mejor pronóstico y mejor tasa de supervivencia específica por edad que los CECC VPH-. Dicho resultado es independiente de: estado ganglionar, edad, estadio, diferenciación del tumor y estrategia de tratamiento. La explicación no se entiende con claridad hoy en día, pero probablemente sería una combinación de varios factores que se relacionan con el paciente (edad más joven, menos expuestos al tabaco y al alcohol, menos comorbilidad, etc.), así como los factores relativos al tumor (presencia de la apoptosis mediada por p53 en tumores VPH+ y otros factores inmunológicos relacionados con la infección VPH).

De hecho, los marcadores moleculares que distinguen los CECC VPH+ de los VPH- han mostrado correlación con el pronóstico del tumor. Existe una asociación entre la mejoría en la supervivencia global y la infección VPH transcripcionalmente activa, demostrada por una elevación de los niveles de p16 en células tumorales infectadas por

VPH. Los CECC VPH+ presentan casi siempre sobreexpresión del p16 (más del 86%), asociada a mayores tasas de supervivencia, en comparación con CECC VPH-. Al ser una rareza la sobreexpresión del p16 en los CECC VPH negativos, se considera que es un marcador suplente para los CECC VPH positivos, y como estos tienen mejor pronóstico que los CECC VPH negativos, tras aplicar QT de inducción con o sin RT (18), hace que la sobreexpresión p16 sea un factor pronóstico favorable e independiente. La positividad al p16 confiere un beneficio, supervivencia, que es independiente de los parámetros clinicopatológicos, tal como la clasificación TNM (19).

El estado del VPH es un factor pronóstico de supervivencia, en respuesta al tratamiento y control del tumor. Numerosos estudios realizados en carcinoma de orofaringe afirman que los tumores VPH+ tienen mejor pronóstico que los VPH-, en cuanto a supervivencia global (la tasa de supervivencia global para los pacientes con tumores orofaríngeos VPH+ es del 80 al 95% a los 2-3 años, mientras para los pacientes con tumores VPH- es del 57-62%), a pesar de su tendencia a presentar metástasis ganglionares y diagnosticarse en estadios avanzados, e independientemente de la modalidad de tratamiento aplicado (20), pues tienen menor riesgo de desarrollar un segundo tumor primario y muestran mayor respuesta a la QT de inducción; de ahí que en estos tumores la opción QT-RT sea el tratamiento de elección en los protocolos de preservación de órgano.

Esto hace que el estado del VPH sea el factor biológico predictor más importante en CECC. De hecho, la NCCN Guidelines recomienda realizar el screening con VPH DNA/p16 en tumores de orofaringe, basándose en su significado pronóstico, y autores como Fisher y Lewis et ál. sugieren que la detección inmunohistoquímica del p16 es el marcador pronóstico más relevante y mejor test para estratificar el riesgo de los tumores de orofaringe, por estar ampliamente disponible y ser fácil de realizar e interpretar (21). König la considera como un método de prescreening para carcinomas de cabeza y cuello (22). Goldenberg et ál. demostraron que la detección del VPH en tejido tumoral puede ayudar a localizar el sitio del tumor primario de origen para los pacientes con metástasis regionales (23).

La participación activa de la infección por VPH en la carcinogénesis laríngea no está claramente establecida, pero podría realizarse una intervención precoz en posteriores estudios, mediante terapias novedosas contra células infectadas por VPH, actuando de tratamiento adyuvante, pues el VPH16 es el serotipo VPH más asociado en cáncer de laringe, al igual que en cáncer de cérvix, donde la vacuna es eficaz.

La controversia existente en la verdadera prevalencia de la infección por VPH, la actividad carcinogénica del VPH y su interacción con otros factores de riesgo, como tabaco y alcohol en el cáncer laríngeo, requiere posteriores investigaciones para aclarar esto; aunque los mayores esfuerzos se deberían centrar en utilizar el estado VPH, y sobre todo el p16, por su mayor simplicidad, como factor pronóstico a

la hora de aplicar terapias de preservación de órgano, pues los tumores VPH+ tienen mejor supervivencia respecto a los tumores VPH-.

Conclusiones

- Se confirma la acción lesiva del tabaco en el cáncer laríngeo, al ser todos fumadores, y la predominancia en el sexo masculino, independientemente de estar presente la infección por VPH.
- La histología predominante es carcinoma escamoso poco diferenciado.
- La ubicación supraglótica es ligeramente más frecuente, aunque la positividad del p16 es independiente de la localización laríngea.
- La presencia de la proteína p16 es más notable en estadios avanzados, por lo que no debe utilizarse como técnica de screening.
- El 20% de los tumores laríngeos estudiados presentan la proteína p16 y, por tanto, serían VPH+, susceptibles de aplicar quimioterapia de inducción.

Conflicto de intereses

Ninguno declarado.

REFERENCIAS

1. Riechelmann H. Human papilloma virus in head and neck cancer. *Laryngorhinootologie*, 2010; 89 (1): 43-8.
2. Marklund L, Hammarstedt L. Impact of HPV in Oropharyngeal Cancer. *J Oncol*, 2011; 509036.
3. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, et ál. EGFR, p 16, HPV Titer, Bcl-XL and p53 and smoking as indicators response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol*, 2008; 26: 3128-37.
4. Stelow ES, Jo VY, Stoler M, Mills S. Human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of upper aerodigestive tract. *Am J Surg Pathol*, 2010; 34 (7): 215-24.
5. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S et ál. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 2008; 100: 407-20.
6. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H et ál. Improved survival of HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*, 2008; 100: 260-9.
7. Smith EM, Wang D, Kim Y, Rubenstein LM, Lee JH, Haugen TH, Turek LP. P16 Expression, human papillomavirus and survival in Head and Neck Cancer. *Oral Oncology*, 2008; 44: 133-42.
8. Lewis JS, Thorstad W, Chernock R et ál. P16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: An entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol*, 2010; 34 (8): 1088-96.
9. Snow A, Laudadio J. HPV detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Adv Anat Pathol*, 2010; 17 (6): 394-403.

10. Allen C, Lewis J, El-Mofty S, Haughey B. Human Papillomavirus and Oropharynx Cancer. Biology, detection and clinical implications. *Laryngoscope*, 2010; 120: 1756-68.
11. Fisher CA, Kampmann M, Zlobec J et ál. P16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann Oncol*, 2010; 21: 1961-1966.
12. Baumann JL, Cohen S, Evjen AN, Law JH, Vadivelu S, Attia A, Schindler JS, Chung CH, Wirth PS, Meijer CJ, Yarbrough WG, Slebos RJ. Human papillomavirus in early laryngeal carcinoma. *Laryngoscope*, 2009; 119 (8): 1531-7.
13. Torrente M, Rodrigo J, Haigentz M et ál. HPV infections in laryngeal cancer. *Head Neck*, 2010; 10: 1-10.
14. Mendenhall WM, Logan HL. Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer. *Am J Clin Oncol*, 2009; 32: 535-9.
15. Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, Palermo R. Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*, 2009; 119 (8): 1542-9.
16. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol*, 2006; 24: 2606-11.
17. Mendelsohn A, Lai CH, Shintaku P. Histopathologic findings of HPV and HPV positive HNSCC. *Laryngoscope*, 2010; 120: 1788-94.
18. Ahmed A, Cascarini L, Sandison A, Clarke P. Survey of the use of tests for human papillomavirus and epidermal growth factor receptor for squamous cell carcinoma of the head and neck in UK head and neck multidisciplinary teams. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2011; Mar 28 (Epub ahead of print).
19. Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol*, 2002; 55: 58-60.
20. Fisher CA, Kampmann M, Zlobec J et ál. P16 expression in oropharyngeal cancer: its impact on staging and prognosis compared with the conventional clinical staging parameters. *Ann. Oncol.*, 2010; 21: 1961-1966.
21. Fisher CA, Zlobec I, Green E, Probst S et ál. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of treatment modality? *Int J Cancer*, 2010; 126: 1256-62.
22. Köning F, Krekeler G, Hönin JF, Cordon-Cardo C, Fisher G, Korabiowska M. Relation between human papillomavirus positivity and p16 expression in head and neck carcinomas. A tissue microarray study. *Anticancer Research*, 2007; 27: 283-8.
23. Shonka DC, Shoushtari A, Thomas C, Moskaluk C et ál. Predicting residual neck disease in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radiation therapy. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2009; 135: 1126-32.
24. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-Associated p16 INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*, 2009; 7.
25. Ang KK, Harris J, Wheeler R et ál. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*, 2010; 363 (19): 24-35.
26. Lewis J, Ukpo OC, Ma X et ál. 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: 982-991.