

PREVALENCE AND IMPACT ON CLINICOPATHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF HUMAN PAPILLOMAVIRUS-16 DNA IN CERVICAL LYMPH NODE METASTASES OF HEAD AND NECK SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Daniel Weiss, MD, Mario Koopmann, MD, Claudia Rudack, MD

Department of Otorhinolaryngology–Head and Neck Surgery, University Hospital Muenster, Muenster, Germany.
E-mail: daniel.weiss@ukmuenster.de

Accepted 7 June 2010

Published online 24 August 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/hed.21548

Gaudencio Barbosa – R3 CCP
Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço
HUWC

Introdução

- ▶ CEC em cabeça e pescoço é a quinta causa de cancer com aproximadamente 500.000 novos casos/ano
 - ▶ Dos casos novos diagnosticados, 40–50% sobreviverão por mais de cinco anos
 - ▶ Tratamento padrão: ressecção do primário com esvaziamento seguido de radio e quimioterapia
- 

Introdução

- ▶ Os mais importantes fatores de risco para CEC são tabaco e álcool
 - ▶ O papiloma virus humano 16 (HPV 16) tem sido determinado como fator de risco independente para CECCCP por vários estudos
 - ▶ A prevalencia varia em cada estudo (0 a 100%)
- 

Introdução

- ▶ HPV altera o ciclo celular através dos oncogenes virais E6 e E7 levando a expressão da CDKN2A/p16 (inibidor do complexo D ciclina quinase dependente, que fosforila pRb em células não infectadas pelo HPV, bloqueando a progressão do ciclo celular)

Introdução

- ▶ Os pacientes com CEC pelo HPV são jovens, não tem história de consumo de tabaco e álcool e tem melhor prognóstico após tratamento padrão
 - ▶ HPV parece ter afinidade pelas tonsilas e base da língua
 - ▶ Criptas tonsilares são semelhantes a zona de transformação do colo do útero
- 

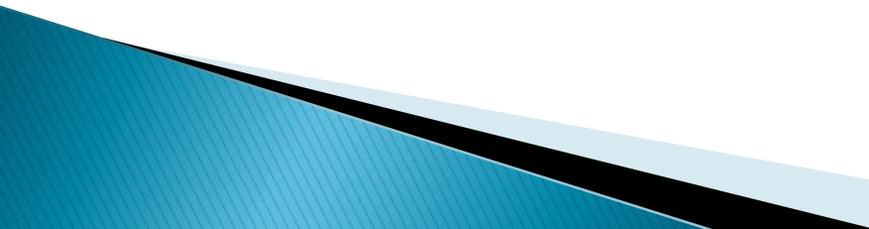
Introdução

- ▶ Tecidos com CEC HPV positivos apresentam aspecto basalóide e metástase linfonodal cística
- ▶ O foco deste estudo foi a prevalência de HPV 16 nas metástases linfonodais e o impacto nas características clinico-patológicas

Pacientes e Métodos

- ▶ Blocos de parafina fixados com formalina foram obtidos de 131 pacientes com diagnóstico de CEC de faringe entre setembro de 2001 a março de 2009
 - ▶ Diagnóstico histológico baseado no HE por 2 patologistas independentes
- 

Pacientes e Métodos

- ▶ Foram analisados também 20 linfonodos de metastase cervical
 - ▶ Todos os pacientes receberam endoscopia da faringe, laringe, traqueia, bronquio e esofago e CT do cranio e pescoço, torax e abdome antes da terapia
 - ▶ Em caso de tumor primario desconhecido foi realizado PET com F18-FDG
- 

Pacientes e Métodos

- ▶ Se o primário não for localizado, realizou-se tonsilectomia bilateral e biopsia as cegas da base da língua e epifaringe
 - ▶ Os pacientes receberam irradiação ou quimioterapia
 - ▶ Em casos com metástase a distância os pacientes foram tratados com quimioterapia
- 

Pacientes e Métodos

- ▶ Cultura celular
 - ▶ Extração de DNA
 - ▶ Detecção do HPV 16 E6/E7 por PCR em tempo real
 - ▶ Imuno-histoquímica para p16
 - ▶ Análise estatística
- 

Resultados

Table 2. Results of HPV16 real-time PCR and p16 immunohistochemistry in HNSCC of different anatomical localizations ($n = 131$).

Tumor subsite	No. of patients (%)	HPV16 PCR positive		p16 overexpression	
		No. of patients (%)	<i>p</i> value	No. of patients (%)	<i>p</i> value
Tonsil	45 (34.35)	17 (37.78)	.060	18 (40.00)	.021
Base of the tongue	32 (24.43)	16 (50.00)	.001	12 (37.50)	.166
Tonsil + base of the tongue	77 (58.78)	33 (42.86)	<.000001	30 (38.96)	.0001
Anterior two-thirds of the tongue	19 (14.50)	1 (5.26)	NS	2 (10.53)	NS
Floor of the mouth	15 (11.45)	0 (0.00)	NS	1 (6.67)	NS
Hypopharynx	7 (5.34)	0 (0.00)	NS	1 (14.29)	NS
Soft palate	9 (6.87)	0 (0.00)	NS	1 (11.11)	NS
Posterior pharyngeal wall	3 (2.29)	1 (33.33)	NS	0 (0.00)	NS
Unknown	1 (0.76)	0 (0.00)	NS	0 (0.00)	NS
Total	131 (100.00)	35 (26.72)		35 (26.72)	

Abbreviations: HPV16, human papillomavirus 16; PCR, polymerase chain reaction; HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; HPV16-PCR-positive, HPV16-DNA detection in real-time PCR; p16-overexpression, number of patients with overexpression of tumor suppressor gene CDKN2A/p16 in immunohistochemistry (IHC); *p*, result of Fisher exact test; NS, not significant.

Resultados

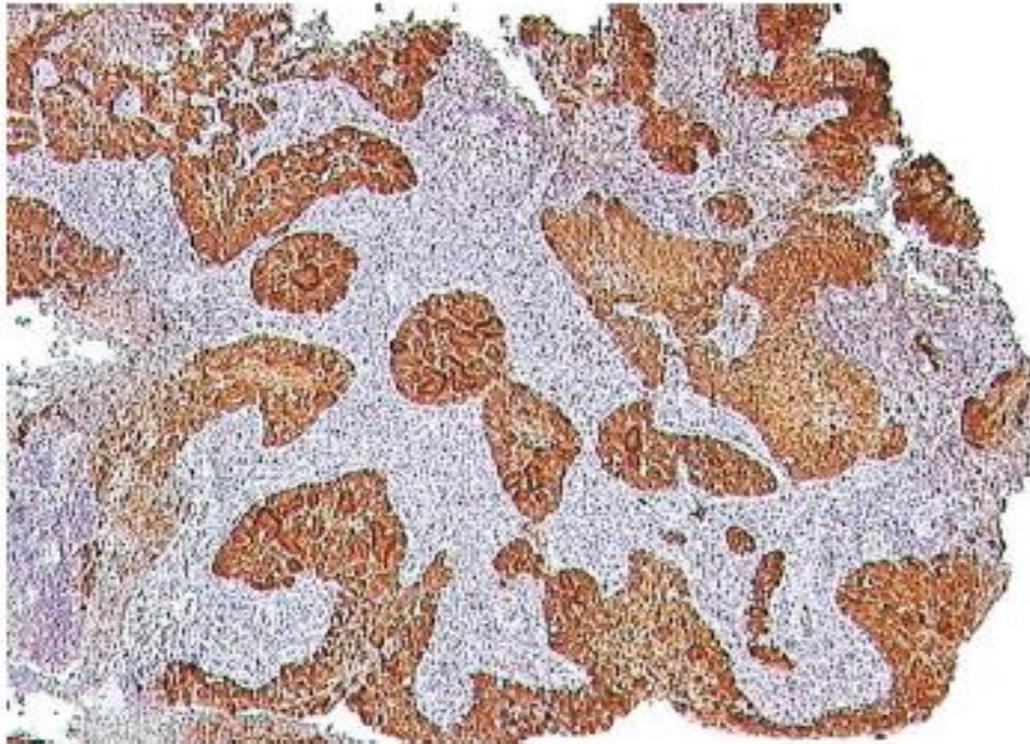


FIGURE 1. Immunohistochemical staining of *p16* in a squamous cell carcinoma of the tonsil; carcinoma of unknown primary (CUP) patient number 2 of Table 5 (original magnification $\times 100$). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Resultados

- ▶ Prevalência de HPV 16 – DNA e expressão de p16 em metástase linfonodal cervical de CEC HPV 16 positivo: Onze tumores primários foram localizados na base da língua e 9 em tonsilas. HPV 16 DNA e p16 foram encontrados em todas as 20 metástases

Resultados

Table 3. Hazard ratios for overall survival of different subgroups of patients with HNSCC.

Subgroup	No. of patients	Median overall survival, mo	Hazard ratio (95% CI)	p value
HPV16+ vs HPV16-	31 vs 88	29.3 vs 20.5	0.249 (0.188–0.660)	.001
P16+ vs p16-	32 vs 87	26.8 vs 21.3	0.391 (0.244–0.864)	.016
Age <60 y vs age ≥60 y	53 vs 66	25.8 vs 20.3	0.809 (0.448–1.446)	.467
Sex: male vs female	85 vs 34	21.7 vs 25.3	1.471 (0.768–2.704)	.255
Alcohol vs no alcohol	65 vs 54	22.7 vs 22.8	1.416 (0.786–2.544)	.247
Nicotine vs no nicotine	91 vs 28	22.5 vs 23.8	1.290 (0.642–2.543)	.485
Stage ≥IV vs stage <IV	64 vs 55	19.7 vs 26.3	3.450 (1.843–5.996)	.0001
T1–2 vs T3–4	75 vs 43	25.9 vs 17.8	0.350 (0.143–0.545)	.0002
N0–1 vs N2–3	57 vs 61	25.3 vs 20.7	0.304 (0.175–0.575)	.0002

Abbreviations: HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; HPV, human papillomavirus; Stage, Union Internationale Contre le Cancer-stage; T, tumor size; T1, <2 cm; T2, 2–4 cm; T3, >4 cm; T4, tumor infiltrates adjacent structures; N, status of regional lymph node metastasis; N0, no metastasis; N1, single ipsilateral lymph node metastasis, size <3 cm; N2a, single ipsilateral lymph node metastasis, size 3–6 cm; N2b, multiple ipsilateral lymph node metastases, size 3–6 cm; N2c, multiple ipsilateral and contralateral lymph node metastases, size 3–6 cm; N3, lymph node metastasis, size >6 cm.

Resultados

Table 4. Hazard ratios for progression-free survival of different subgroups of patients with HNSCC.

Subgroup	No. of patients	Progression-free survival, mo	Hazard ratio (95% CI)	<i>p</i> value
HPV16+ vs HPV16-	31 vs 88	28.9 vs 16.1	0.226 (0.170-0.597)	.004
P16+ vs p16-	32 vs 87	25.9 vs 17.0	0.354 (0.222-0.782)	.006
Age <60 y vs age ≥60 y	53 vs 66	22.1 vs 17.2	0.840 (0.464-1.505)	.549
Sex: male vs female	85 vs 34	18.2 vs 22.5	1.453 (0.759-2.687)	.270
Alcohol vs no alcohol	65 vs 54	18.4 vs 20.6	1.549 (0.862-2.792)	.143
Nicotine vs no nicotine	91 vs 28	18.6 vs 21.9	1.302 (0.648-2.583)	.466
Stage ≥IV vs stage <IV	64 vs 55	16.5 vs 22.8	3.619 (1.970-6.481)	< .0001
T1-2 vs T3-4	75 vs 43	22.6 vs 14.1	0.339 (0.131-0.511)	.0001
N0-1 vs N2-3	57 vs 61	22.1 vs 17.1	0.290 (0.162-0.538)	.0001

Abbreviations: HNSCC, head and neck squamous cell carcinoma; CI, confidence interval; HPV, human papillomavirus; Stage, Union Internationale Contre le Cancer-stage; T, tumor size; T1, <2 cm; T2, 2-4 cm; T3, >4 cm; T4, tumor infiltrates adjacent structures; N, status of regional lymph node metastasis; N0, no metastasis; N1, single ipsilateral lymph node metastasis, size <3 cm; N2a, single ipsilateral lymph node metastasis, size 3-6 cm; N2b, multiple ipsilateral lymph node metastases, size 3-6 cm; N2c, multiple ipsilateral and contralateral lymph node metastases, size 3-6 cm; N3, lymph node metastasis, size >6 cm.

Resultados

Table 5. Clinicopathological characteristics of 13 patients first presented with carcinoma in cervical lymph node metastases and unknown primary (CUP).

Case no.	Sex	Age, y	Tumor subsite	G	T	N	M	Stage	Histology	HPV16	p16-IHC	F-18-PET	Follow-up, mo
1	F	49	T	2	1	1	0	III	CLNM	Positive	Positive	Negative	52
2	M	88	T	3	1	2b	0	Iva		Positive	Positive	Negative	49
3	F	50	T	3	2	2b	0	Iva		Positive	Positive	Positive	50
4	F	59	T	2	1	1	0	III	CLNM	Positive	Positive	Negative	60
5	F	56	T	3	1	1	0	III		Positive	Positive	Negative	56
6	F	51	T	1	1	1	0	III	CLNM	Positive	Positive	Negative	58
7	F	48	TB	3	1	2b	0	Iva	CLNM	Positive	Positive	No	23
8	M	56	TB	2	U	1	0	U		Positive	Positive	Negative	40
9	F	60	TB	2	1	2b	0	Iva	CLNM	Positive	Positive	No	73
10	M	58	TB	2	U	1	0	U		Positive	Negative	Positive	62
11	F	56	T	2	1	2b	0	Iva		Positive	Positive	No	41
12	F	72	TB	3	1	1	0	III	CLNM	Positive	Positive	Negative	44
13	M	62	U	U	U	U	1	IVc		Negative	Negative	Negative	13 [†]

Abbreviations: F, female; M, male; T, tonsil; TB, tongue base; T1, tumor size <2 cm; T2, tumor size 2–4 cm; T3, tumor size >4 cm; T4, tumor infiltrates adjacent structures; U, unknown; N (cervical lymph node metastases); N0, no regional lymph node metastasis; N1, single ipsilateral lymph node metastasis (size <3 cm); N2a, single ipsilateral lymph node metastasis (size 3–6 cm); N2b, multiple ipsilateral lymph node metastases (size 3–6 cm); N2c, multiple ipsilateral and contralateral lymph node metastases (size 3–6 cm); N3, lymph node metastasis (size >6 cm); M, distant metastases; M0, no distant metastases; M1, distant metastases; CLNM, cystic lymph node metastasis; BC, basaloid carcinoma; HPV16, real-time PCR for high-risk human papillomavirus 16; p16-IHC, immunohistochemical staining of tumor suppressor gene CDKN2A/p16; F-18-PET (F-18-fluorodeoxyglucose positron emission tomography): no, F-18-FDG-PET has not been carried out in this case.

[†]Patient died 13 months after diagnosis.

Resultados

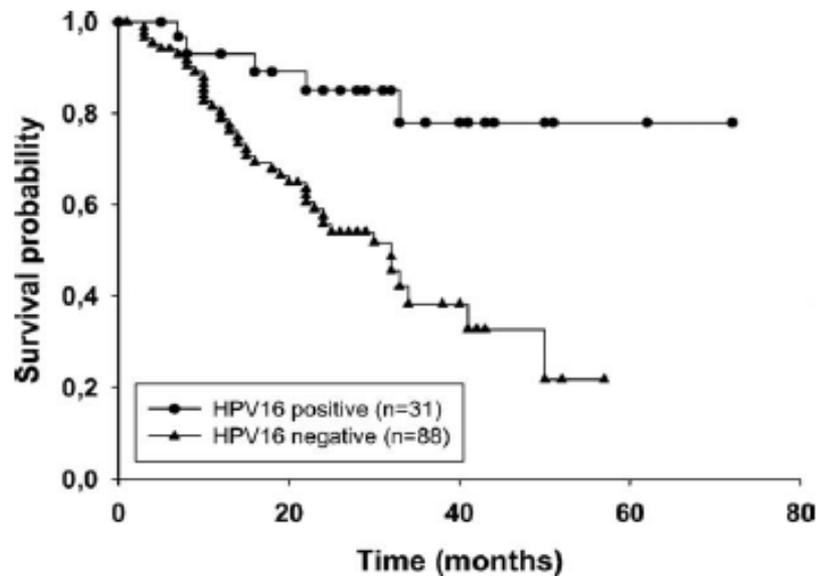


FIGURE 2. Relationship between human papillomavirus (HPV)16-polymerase chain reaction (PCR) results and overall survival in 119 patients with head and neck squamous cell carcinoma ($p = .001$; hazard ratio, 0.25; 95% confidence interval, .04–1.5).

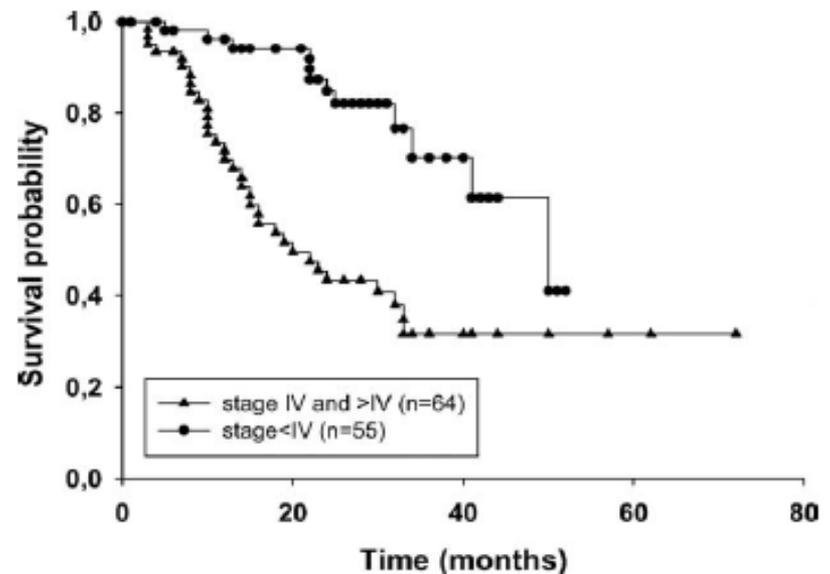


FIGURE 4. Relationship between stage and overall survival in 119 patients with head and neck squamous cell carcinoma ($p = .0001$; hazard ratio, 3.45; 95% confidence interval, 1.84–6.00).

Resultados

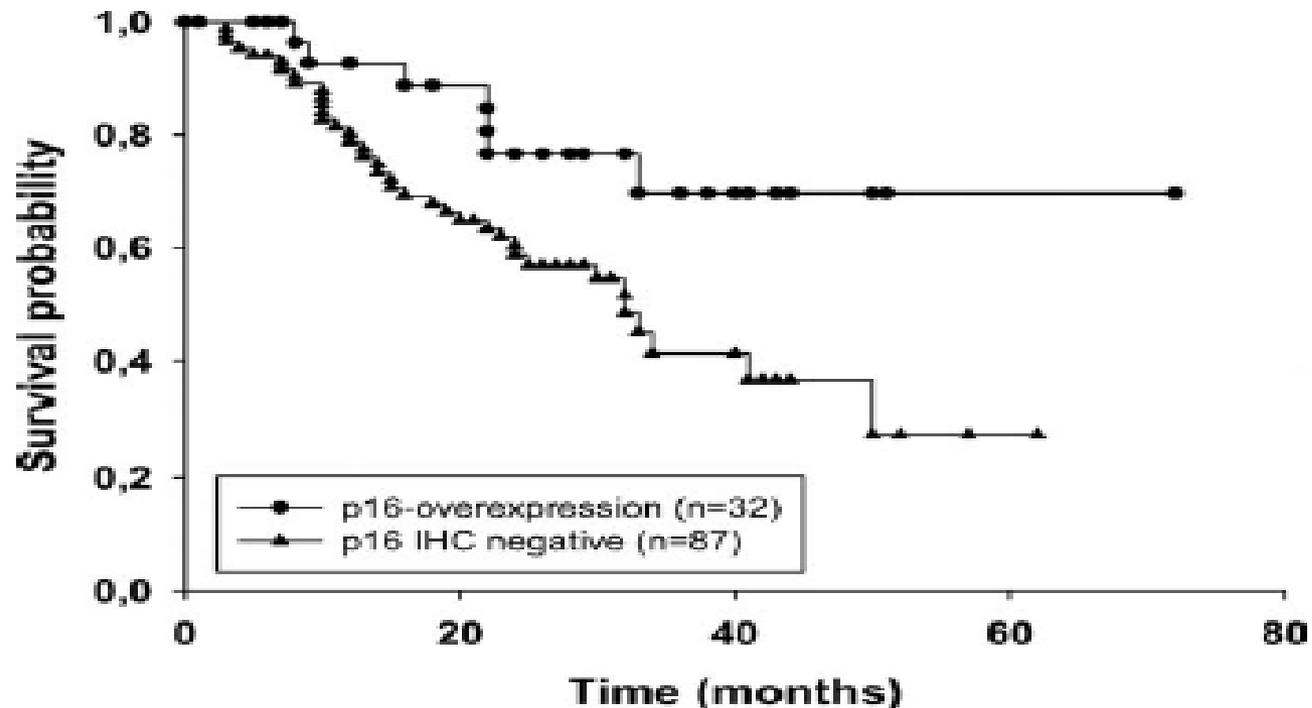


FIGURE 3. Relationship between overexpression of *p16* in Immunohistochemistry (IHC) and overall survival in 119 patients with head and neck squamous cell carcinoma ($p = .02$; hazard ratio, 0.39; 95% confidence interval, 0.24–0.86).

Discussão

- ▶ Infecção pelo HPV 16 é aceita como fator de risco para CEC em cabeça e pescoço
 - ▶ Neste estudo 27% dos casos analisados foram positivos para HPV 16
 - ▶ Carcinomas das tonsilas e base da língua tem forte correlação com a presença do HPV16
- 

Discussão

- ▶ O verdadeiro impacto do HPV 16 no desenvolvimento do tumor foi demonstrado pela imunohistoquímica do CDKN2A/p16, gene supressor tumoral que tem sua expressão aumentada em células HPV infectadas

Discussão

- ▶ CEC associado ao HPV está ligado a pacientes jovens com menor consumo de nicotina e álcool
 - ▶ Não há forte correlação entre o status do HPV e consumo de álcool e nicotina neste estudo
 - ▶ Estudo demonstra um desfecho favorável para casos com HPV positivo
- 

Discussão

- ▶ HPV 16– DNA e superexpressão de p16 foram fatores de prognóstico independentes tanto para sobrevida global como para sobrevida livre de doença
- ▶ Em 20 casos foram encontrados positividade para HPV e superexpressão de p16 nas metástases linfonodais

Discussão

- ▶ O desfecho favorável de pacientes HPV16 positivos com CEC de cabeça e pescoço pode conduzir a uma mudança no tratamento padrão em um futuro próximo
 - ▶ Outros estudos prospectivos são necessários para provar a vantagem da RT ou RT + QT nos pacientes com CEC em CCP HPV16 positivos
- 