

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES MÉDICAS

**CARCINOMA ESCAMOSO DE CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE ASOCIADO A VIRUS DEL
PAPILOMA HUMANO: CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS, HISTOPATOLÓGICAS Y LA
IMPORTANCIA DE LAS PRUEBAS INMUNOHISTOQUÍMICAS Y MOLECULARES EN SU
DIAGNÓSTICO**

**Revisión bibliográfica sometida a la consideración de la Comisión del Programa de Estudios de
Posgrado en Especialidades Médicas para optar al grado y título de especialista en Anatomía
Patológica**

JUAN CARLOS JOHANNING CORDERO

**SERVICIO DE PATOLOGÍA, HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS
CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO
SAN JOSÉ, COSTA RICA**

2020

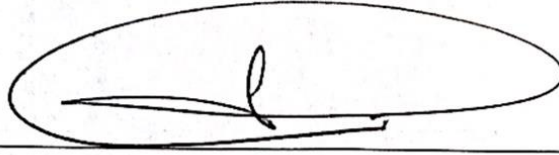
DEDICATORIA

A mis padres, hermanos y novia por siempre estar ahí para mi y darme todo su apoyo incondicional en este capítulo tan importante en mi vida.

AGRADECIMIENTOS

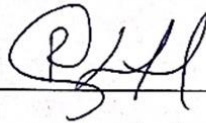
Un agradecimiento especial a todo el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital San Juan de Dios, por cuatro años de enseñanzas y formación que me acompañarán por toda mi vida profesional. De cada uno de ustedes aprendí algo valioso que me hizo crecer en el campo personal y profesional.

"Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Especialidades Médicas de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado y título de Maestría Académica/Doctorado Académica en Anatomía Patológica"



Dr. Armando Meneses Madriz

Profesor Guía



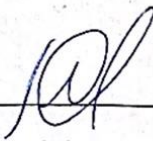
Dra. Rosaura Conejo Cantillo

Lectora



Dra. Mónica Mohs Alfaro

Representante del Programa de Posgrado en Anatomía Patológica



Juan Carlos Johanning Cordero

Sustentante



UNIVERSIDAD DE
COSTA RICA

SEP Sistema de
Estudios de Posgrado

Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Juan Carlos Johanning Cordero, con cédula de identidad 113200627, en mi condición de autor del TFG titulado Carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe asociado a virus del papiloma humano: características epidemiológicas, histopatológicas e importancia de las pruebas inmunohistoquímicas y moleculares en su diagnóstico.

Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Juan Carlos Johanning Cordero

Número de Carné: B03349 Número de cédula: 113200627

Correo Electrónico: juanc199@hotmail.com

Fecha: 14 de enero de 2021 Número de teléfono: 6054-8005

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Dr. Armando Meneses Madriz


FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	x
OBJETIVOS	xii
ÍNDICE DE CUADROS	xiii
ÍNDICE DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS Y GLOSARIO DE TÉRMINOS	xv
INTRODUCCIÓN	1
MARCO TEÓRICO	3
ANATOMÍA DE LA CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE	3
HISTOLOGÍA DE LA CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE	5
CARCINOMA ESCAMOSO DE CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE VPH POSITIVO, GENERALIDADES	6
Epidemiología	6
Diferencias clave del CECOOF VPH positivo con el CECOOF VPH negativo	8
Factores de riesgo	10
Manifestaciones clínicas.....	13
Características radiológicas	14
Características Patológicas Macroscópicas y Microscópicas	15
Diagnóstico	17
Pronóstico y Tratamiento	18
Estadificación	19
PROCESAMIENTO DE BIOPSIAS DE CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE	22
ONCOGÉNESIS DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CAVIDAD Y OROFARINGE VPH POSITIVO	23
Mecanismo carcinogénico del VPH.....	25
MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL VIRUS Y MARCADORES SUSTITUTIVOS DE MÉTODOS DIRECTOS	27
Marcadores sustitutivos de métodos directos, IHQ para p16	28
Detección de antígenos por IHQ	29
Hibridación in situ cromogénica (CISH).....	29
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	30
Ensayos de fase líquida.....	31
Detección de ARNm para E6/E7 mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por transcriptasa reversa (qRT-PCR).....	31
Utilidad de las pruebas.....	32
Pruebas para detección de VPH en metástasis a ganglios linfáticos cervicales de un CEOF oculto	33
Rentabilidad de las pruebas para VPH.....	34
PREVENCIÓN DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE VPH POSITIVO	34

Prevencción primaria	34
Prevencción secundaria	37
FUTUROS ESTUDIOS REQUERIDOS A NIVEL MUNDIAL Y A NIVEL NACIONAL	39
<i>CONCLUSIONES</i>.....	41
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>.....	43

RESUMEN

El carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe es una neoplasia maligna que se presenta con mucha frecuencia y exhibe dos tipos principales según su asociación o no con la infección con el virus del papiloma humano (VPH): carcinoma escamoso VPH positivo y carcinoma escamoso VPH negativo; siendo la variante VPH positivo la que ha incrementado su incidencia considerablemente en las últimas décadas.

Esta revisión bibliográfica se enfoca principalmente en las características distintivas del tipo VPH positivo, considerando las variables epidemiológicas como el sexo, la edad de presentación, y los factores de riesgo principales; clínicas como el sitio anatómico de la lesión y la focalidad tumoral; y anatomopatológicas como el tipo histológico y el resultado de pruebas complementarias como la expresión inmunohistoquímica de p16 y la detección de ADN viral mediante hibridación in situ con cromógeno (CISH) para VPH de alto riesgo y reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se discutirá, además, la sensibilidad y especificidad de la inmunohistoquímica para p16 y del CISH para VPH de alto riesgo, utilizando como estándar de oro la PCR para la detección de ADN o ARN viral.

También, se analizará el pronóstico y la respuesta al tratamiento tan particulares del carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe VPH positivo en contraste con el VPH negativo, así como los distintos métodos preventivos y de tamizaje propuestos y la importancia de realizar estudios observacionales e intervencionales a nivel nacional para determinar si esta neoplasia presenta en nuestra población un comportamiento similar al descrito a nivel internacional.

Los resultados de las investigaciones estudiadas muestran que el carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe VPH positivo suele presentarse en hombres más jóvenes, no fumadores (o sin historia de uso de otras presentaciones de tabaco), con historia de múltiples parejas sexuales y de práctica de sexo oral sin protección. Estos tumores se presentan casi exclusivamente en la región de la orofaringe, son unifocales y usualmente tienen metástasis a ganglios linfáticos cervicales al momento del diagnóstico. El subtipo histológico más común es el basaloide y en la mayoría de los casos son tumores no queratinizantes o con queratinización focal. Por otro lado, el carcinoma escamoso VPH negativo es propio de hombres de mayor edad, fumadores o con historia de uso de tabaco no fumado y no tiene asociación con el número de parejas sexuales ni con la práctica de sexo oral. Estas neoplasias suelen formarse en la cara lateral de la lengua o piso de la boca, con frecuencia son multifocales y con presencia de metástasis cervicales al diagnóstico. El subtipo histológico más común es el clásico queratinizante. Con respecto al pronóstico, el carcinoma escamoso VPH positivo tiene una mayor supervivencia debido a una mejor respuesta al

tratamiento y a un menor índice de recurrencias, siendo actualmente la positividad para VPH el factor pronóstico más importante en el carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe. Las pruebas de inmunohistoquímica para p16 y de hibridación in situ para VPH han demostrado tener una sensibilidad y especificidad alta para identificar la presencia o no del VPH en un carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe, utilizando la PCR como estándar de oro. El p16 es el más sensible y específico de ambos marcadores.

Los métodos de prevención primaria y secundaria contra el desarrollo del carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe VPH positivo no han demostrado ser eficaces debido a que no se ha logrado identificar una lesión precursora y debido al pequeño tamaño del tumor primario incluso cuando ha hecho metástasis a ganglios linfáticos cervicales. Por esta razón, la esperanza para disminuir la incidencia de este cáncer está en la vacuna contra los serotipos de alto riesgo del VPH.

Existen diversas vacunas disponibles en la actualidad y se están desarrollando nuevas contra un mayor número de serotipos de alto riesgo. Si bien no hay estudios disponibles que demuestren la efectividad de la vacuna en reducir la incidencia de este tipo de cáncer, se espera que en los próximos años se completen varios estudios actualmente en curso que así lo muestren. Esto con el fin de aprobar la vacuna también en niños varones, específicamente para combatir el aumento de casos de este tipo de cáncer, como se ha logrado en el carcinoma de cuello uterino en mujeres. Se espera que, con una aprobación de la vacuna para este fin, se vea un decremento considerable en la incidencia del carcinoma escamoso de orofaringe VPH positivo para el año 2060.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) of the oral cavity and oropharynx is a very frequent malignant neoplasm that exhibits two main types regarding its association with Human Papillomavirus (HPV) infection: HPV-positive SCC and HPV-negative SCC. It is HPV-positive SCC the variant which has considerably increased its incidence in the last decades.

This bibliographical review has its main focus on the distinguishing features of these two types of SCC, considering factors such as sex, age at presentation, main risk factors, anatomical site of the lesion, presence of multifocality, histological type, and the results of ancillary tests like immunohistochemical expression of p16 and detection of viral DNA with chromogenic in situ hybridization (CISH) for high-risk HPV, and polymerase chain reaction (PCR). Sensitivity and specificity of the immunohistochemistry for p16 and of CISH for high-risk HPV will also be discussed, using as gold standard PCR for detection of viral DNA or RNA.

Furthermore, the distinguishing features of better prognosis and treatment response of HPV-positive oropharyngeal SCC in contrast to HPV-negative SCC will also be analyzed, as well as the different preventive and screening strategies that have been proposed, and the importance of performing national observational and interventional studies to define if this neoplasm has a similar behavior in our population in comparison to the one described worldwide.

The results of the investigations reviewed show that HPV-positive SCC of the oral cavity and oropharynx usually presents in younger, non-smoking men (or without history of use of other presentations of tobacco), with a history of multiple sexual partners, and practice of unprotected oral sex. These tumors present almost exclusively in the oropharynx, are unifocal, and usually have metastasis to cervical lymph nodes at the time of diagnosis. The most frequent histological subtype is the basaloid, and in most of the cases they are non-keratinizing tumors or have only focal keratinization. On the other hand, HPV-negative SCC is characteristic of older men, who are smokers or have a history of smokeless tobacco, and has no association with the number of sexual partners or with the practice of oral sex. These neoplasms often develop on the lateral border of the tongue or the floor of the oral cavity, are frequently multifocal, and have cervical lymph node metastasis at diagnosis. The most common histological subtype is the classic keratinizing type. Regarding prognosis, HPV-positive SCC has a better survival because of a superior treatment response and a lower rate of recurrences, so that HPV positivity is now considered the most important prognostic factor in oral cavity and oropharyngeal SCC. Immunohistochemistry for p16 and CISH

for HPV have shown a high sensitivity and specificity to determine the presence of HPV in SCCs of oral cavity and oropharynx, using PCR as the gold standard. p16 is the more sensitive and specific of both markers.

Primary and secondary prevention strategies against the development of HPV-positive oral cavity and oropharyngeal SCC have not been effective because a precursor lesion has not been identified and because of the small size of the primary tumor, even when it has metastasized to cervical lymph nodes. Given this, the hope of decreasing the incidence of this cancer is in the vaccine against the high-risk HPV serotypes.

Several vaccines are currently available, and further are being developed against a greater number of high-risk serotypes. Even though, there are no available studies that show the effectiveness of the vaccine in reducing the incidence of this type of cancer yet, it is expected that in the following years the ongoing studies that prove this will be completed. This will enable the approval of the vaccine also in young boys, specifically to fight the increase in cases of this type of cancer, as it has been accomplished with carcinoma of uterine cervix in women. It is likely that with the approval of the vaccine for this purpose, a considerable decrease in the incidence of HPV-positive oropharyngeal SCC will be noticeable for the year 2060.

OBJETIVOS

Objetivo General: establecer un marco teórico que permita comparar la efectividad de las pruebas de inmunohistoquímica para p16 y de hibridación in situ para VPH de alto riesgo en el diagnóstico del carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe en relación al estándar de oro de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Objetivos específicos:

1. Describir las características clínicas, epidemiológicas, histopatológicas, inmunohistoquímicas y moleculares del carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe VPH positivo.
2. Mencionar las principales diferencias de estas características con las del carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe VPH negativo.
3. Definir los conceptos anatómicos de cavidad oral y orofaringe en el contexto del carcinoma escamoso de estas localizaciones.
4. Discutir las distintas pruebas disponibles actualmente para la detección directa del Virus del Papiloma Humano (VPH) y los marcadores sustitutivos de inmunohistoquímica en el carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe.
5. Explicar el funcionamiento molecular de las pruebas mencionadas en el punto anterior.
6. Establecer los parámetros para una correcta interpretación de las pruebas de inmunohistoquímica para p16, de hibridación in situ para VPH y de PCR para la detección de ADN o ARN del VPH en el carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe.
7. Caracterizar la biología molecular del proceso de oncogénesis desde la infección de la mucosa de la cavidad oral y orofaringe por el VPH hasta el desarrollo del carcinoma escamoso de esta zona.
8. Estudiar el funcionamiento de las vacunas actuales y futuras contra el VPH y su impacto en la incidencia de los distintos cánceres relacionados a este virus.
9. Razonar sobre la utilidad de los métodos de prevención primaria y secundaria contra el desarrollo del carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe asociado a VPH propuestos en diversos estudios epidemiológicos como lo son los biomarcadores, la citología, el ultrasonido, entre otros.
10. Proponer posibles estudios epidemiológicos futuros sobre este tema para empezar a obtener datos relevantes sobre estas neoplasias a nivel nacional y así comprender su comportamiento en la población costarricense.

ÍNDICE DE CUADROS

Tabla 1. Comparación de la estadificación del CECOOF entre la 7ª y 8ª edición de la AJCC	20
---	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Límites de la orofaringe	3
Figura 2. Anatomía de las fauces de la cavidad oral	4
Figura 3. Niveles ganglionares del cuello	5
Figura 4. Estadificación del CEOF p16 positivo	21
Figura 5. Estructura genética del Virus del Papiloma Humano	24
Figura 6. Teoría propuesta sobre la carcinogénesis del VPH en humanos	26

LISTA DE ACRÓNIMOS, ABREVIATURAS Y GLOSARIO DE TÉRMINOS

- **ADN:** ácido desoxirribonucleico.
- **AJCC:** American Joint Committee on Cancer (Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer).
- **ARN:** ácido ribonucleico.
- **ARNm:** ácido ribonucleico mensajero.
- **BAAF:** biopsia por aspiración con aguja fina.
- **CAP:** Colegio Americano de Patólogos.
- **CEC:** carcinoma escamocelular.
- **CECO:** carcinoma escamoso de cavidad oral.
- **CECOOF:** carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe.
- **CEOF:** carcinoma escamoso de orofaringe.
- **CDK:** quinasa dependiente de ciclina.
- **CISH:** hibridación in situ cromogénica.
- **CK:** citoqueratina.
- **EEN:** extensión extranodal.
- **FDA:** Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Drogas de los EEUU).
- **FISH:** hibridación in situ con fluorescencia.
- **IgG:** inmunoglobulina G
- **IHQ:** inmunohistoquímica.
- **NCCN:** National Comprehensive Cancer Network (Red Nacional Comprehensiva del Cáncer de EEUU).
- **NIC:** neoplasia intraepitelial cervical.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **OR:** odds ratio (relación de probabilidades).
- **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa.
- **PI3K:** fosfoinositol 3- quinasa.
- **pRb:** proteína retinoblastoma.

- **qRT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por transcriptasa reversa.
- **qPCR:** reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (sinónimo de PCR de tiempo real).
- **RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa por transcriptasa reversa.
- **TERT:** transcriptasa reversa de la telomerasa.
- **VPH:** virus del papiloma humano.

INTRODUCCIÓN

El carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe (CECOOF) es una neoplasia maligna frecuente de cabeza y cuello. Es el cáncer más frecuente en esta región anatómica si se excluye el cáncer de piel no melanoma (1,2). Esta se puede clasificar en CECOOF asociado al Virus del Papiloma Humano (VPH) o VPH positivo y CECOOF no asociado al VPH o VPH negativo. La importancia de esta clasificación está en que estos dos tipos de cáncer varían mucho entre sí no sólo en el factor etiológico, sino también en el sitio anatómico afectado, la edad de presentación, los factores de riesgo, la frecuencia según sexo, las tendencias en la incidencia en los últimos años y hasta en la respuesta al tratamiento, pronóstico y supervivencia (2). El CECOOF VPH positivo suele afectar la región orofaríngea con mucho mayor frecuencia que el resto de la cavidad oral (3), por lo que con frecuencia se le denomina únicamente carcinoma escamoso orofaríngeo (CEOF) VPH positivo.

La incidencia del CEOF VPH positivo ha venido en aumento en las últimas décadas a nivel mundial y en la mayoría de los países que tienen registros epidemiológicos de esta neoplasia, llamando la atención que este aumento se ve con mayor prominencia en países desarrollados de América y del oeste y norte de Europa y que ha resultado en una incidencia que en promedio es 4 veces más alta en hombres que en mujeres (3). También, este incremento en la incidencia se ha acompañado de una disminución de la incidencia del CECOOF VPH negativo, así como de otras neoplasias asociadas al tabaco como el carcinoma de pulmón (3,4). Esto se traduce en un impacto en el sistema de salud, ya que el CEOF VPH positivo suele presentarse principalmente en hombres jóvenes, estimándose un costo en lo que respecta a la atención de este cáncer en el Reino Unido de £30.32 millones en el año 2011 con respecto a £17.21 millones en el año 2007, según un estudio de la Universidad de Liverpool (5).

El hecho de que el CEOF VPH positivo tenga una única causa necesaria para su génesis (la infección con el VPH), presenta una oportunidad extraordinaria para poder desarrollar estrategias de prevención primaria y secundaria (3). Las características tan distintivas de este cáncer en cuanto a epidemiología, clínica y pronóstico han hecho que la octava edición del Manual de Estadificación de la AJCC clasificara en capítulos separados y les diera una estadificación distinta a los carcinomas orofaríngeos VPH positivo y VPH negativo (6). Esto implica que es de suma importancia realizar pruebas de biomarcadores para detectar la infección en los carcinomas escamosos de este sitio anatómico y compararlas entre sí para desarrollar un método diagnóstico fidedigno.

Las vacunas desarrolladas al día de hoy, las cuales todas generan inmunidad contra serotipos de alto riesgo del VPH, entre ellos el serotipo 16 (serotipo más frecuentemente implicado en el desarrollo de CEOF) son prometedoras y se considera que podrían tener un impacto significativo en disminuir la incidencia de este cáncer, a pesar de faltar evidencia para que se de la aprobación de su aplicación masiva en hombres específicamente para combatir el desarrollo de esta neoplasia (7,8).

Los estudios epidemiológicos para lograr comprender mejor la historia natural de la infección con el VPH y su mecanismo en el desarrollo del CEOF, los estudios comparativos entre hombres vacunados y no vacunados y los ensayos clínicos que diseñen y prueben la efectividad y costo-beneficio de estrategias de prevención secundaria y detección temprana de estos tumores son mecanismos adicionales que podrían ayudar a disminuir la incidencia de esta neoplasia a nivel mundial (3). En Costa Rica hay una escasez de bases de datos y estudios epidemiológicos que documenten la incidencia y prevalencia del CEOF y su relación con la infección con el VPH. Es necesario llevar a cabo este tipo de estudios en el país para poder entender el comportamiento de esta neoplasia y de la infección con este virus a nivel oral en la población nacional.

MARCO TEÓRICO

ANATOMÍA DE LA CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE

La orofaringe se encuentra entre el paladar blando y el borde superior de la epiglotis. Su límite superior es una línea horizontal imaginaria desde el paladar blando hacia la pared faríngea posterior, que la delimita de la nasofaringe. Su límite anterior es el istmo de las fauces (abertura hacia la cavidad oral) y la parte posterior del dorso de la lengua. Si bien las amígdalas palatinas y lingual estrictamente hablando se encuentran hacia anterior del límite anterior de la orofaringe, se consideran parte de esta región y no parte de la cavidad oral. El margen inferior de la porción anterior de la orofaringe está marcado por la abertura del seno piriforme al nivel de la punta de la epiglotis. Si se traza una línea horizontal desde este punto hacia posterior, se obtiene el margen inferior de la porción anterior de la orofaringe, el cual es continuo con la hipofaringe. (Ver Figura 1)

Las paredes laterales de las fauces están compuestas hacia cada lado por los dos pilares amigdalinos, entre los cuales está la fosa amigdalina, donde se encuentra la amígdala palatina. El pilar amigdalino anterior es el arco palatogloso, el cual es una estructura curvada hacia inferior y anterior desde el paladar blando hasta la lengua. El pilar amigdalino posterior o arco palatofaríngeo se extiende hacia inferior desde el borde posterolateral del paladar blando lateralmente a lo largo de la pared faríngea. Cada uno de estos arcos contiene un músculo nombrado de la misma forma (9). (Ver Figura 2)

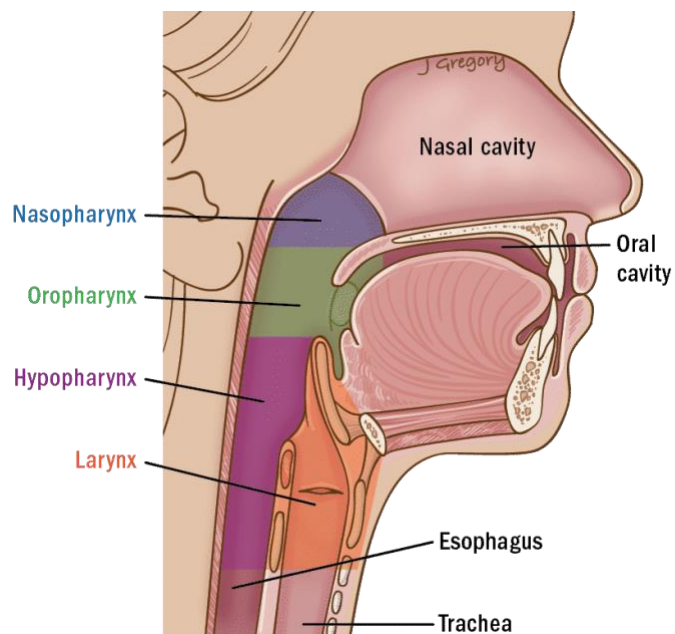


Figura 1. Límites de la orofaringe. (10)

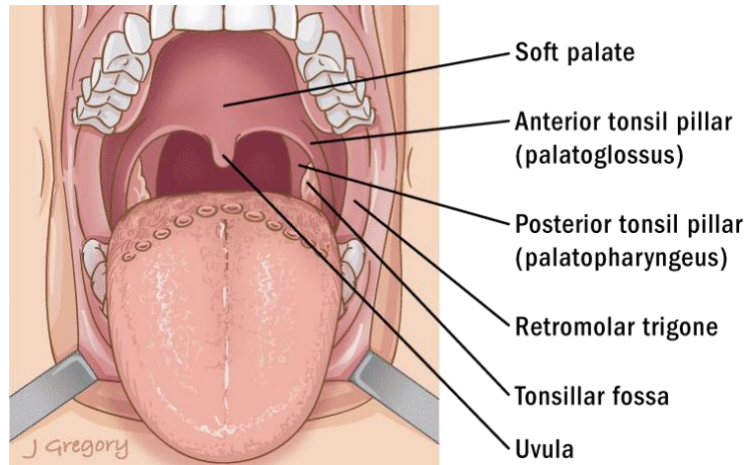


Figura 2. Anatomía de las fauces en cavidad oral. (11)

Las amígdalas palatinas varían mucho de tamaño dependiendo de su estado de reactividad linfoide. La superficie de la amígdala está cubierta por fosas o criptas revestidas de epitelio, las cuales entran al tejido linfoide subyacente. Debajo de las amígdalas se encuentra la fascia faringobasilar, que tiene ramas de tejido fibroso dentro de y alrededor de la amígdala, formando la llamada cápsula amigdalina. El tejido conectivo laxo entre esta cápsula y el músculo constrictor superior que es más profundo, forma un plano de clivaje que facilita la extirpación quirúrgica (9).

Inferior a las fauces, la orofaringe está limitada anteriormente por la parte posterior de la porción inmóvil de la lengua (base de lengua o tercio posterior de lengua). Una línea demarcada por las papilas circunvaladas separa la base de la lengua de la porción móvil de la lengua (dos tercios anteriores) (12). La base de la lengua contiene abundante tejido linfoide submucoso que constituye la amígdala lingual. Esta estructura, junto con las amígdalas palatinas y faríngeas, forma una corona oblicua de tejido linfoide que involucra la orofaringe y nasofaringe que se conoce como el anillo de Waldeyer (9).

Distinguir entre los subsitios anatómicos y bordes de la cavidad oral y orofaringe es importante para el diagnóstico y manejo del CECO y el CEOF. La cavidad oral inicia en la unión mucocutánea de los labios y se extiende posteriormente, incluyendo la cresta alveolar y las encías, los dos tercios anteriores de la lengua, el piso de la boca, la mucosa bucal, el trigono retromolar y el paladar duro. Para efectos de diferenciar los CECO y los CEOF, la orofaringe inicia superiormente en la unión del paladar duro con el paladar blando e inferiormente en las papilas circunvaladas de la lengua. Está limitada hacia superior por la superficie inferior del paladar blando hacia inferior por la epiglotis. Subregiones de la orofaringe

incluyen el paladar blando, las amígdalas palatinas, la base de la lengua, las valléculas y las paredes orofaríngeas propiamente (13).

Los ganglios linfáticos regionales del cuello se clasifican en seis distintos niveles, los cuales están separados por marcas anatómicas clínicas o imagenológicas, de la siguiente manera: nivel I (submentoniano), nivel II (yugular superior), nivel III (yugular medio), nivel IV (yugular inferior), nivel V (fosa supra-clavicular), nivel VI (compartimento central) (13). Estos se pueden apreciar en la Figura 3.

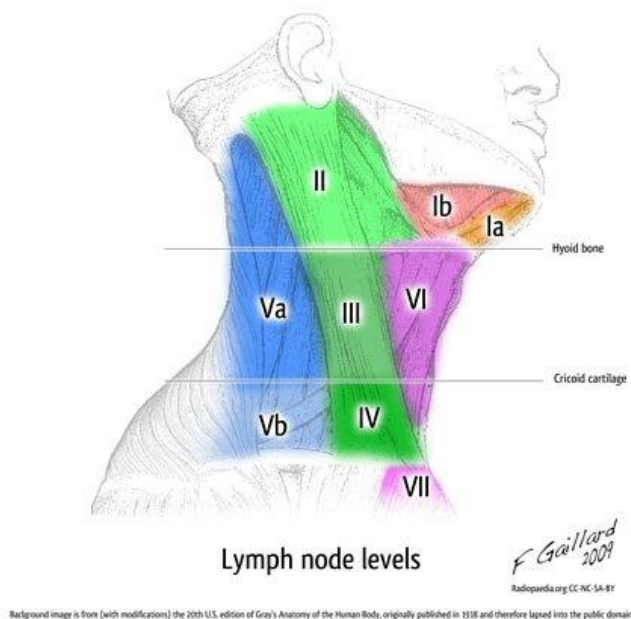


Figura 3. Niveles ganglionares del cuello. (14)

HISTOLOGÍA DE LA CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE

Tanto la orofaringe como la hipofaringe están revestidas de epitelio plano estratificado o escamoso. Esta mucosa típicamente es no queratinizada, sin embargo, puede haber áreas con paraqueratinización u ortoqueratinización en respuesta a procesos que causen irritación crónica. Al igual que en la nasofaringe, la submucosa de la orofaringe e hipofaringe contiene agregados linfoides dispersos, así como glándulas seromucosas submucosas prominentes (9).

El epitelio escamoso estratificado que recubre las amígdalas se extiende dentro de las criptas amigdalinas por considerables distancias. Conforme estos cordones de epitelio se fusionan con el tejido linfoides subyacente, las células epiteliales asumen una apariencia más basaloide y tienen núcleos vesiculares pero uniformes. La unión entre las células linfoides y las islas escamosas está con frecuencia borrada.

Aparentemente, los nidos aislados irregulares de células escamosas focalmente queratinizadas, con frecuencia con núcleos vesiculares, son comunes profundamente dentro de la amígdala. Estos nidos no deben ser confundidos con un carcinoma. Se debe prestar atención a la arquitectura a bajo poder para confirmar que estos nidos están muy aproximados a las criptas amigdalinas y son un hallazgo normal (9).

Se ha demostrado que el epitelio basaloide de las criptas amigdalinas es como la zona de transformación del cuello uterino; ambos son especialmente sensibles a la infección por VPH de alto riesgo. Ahora se reconoce que los CEOF VPH positivos, casi exclusivamente se originan del epitelio de las criptas amigdalinas de las amígdalas palatinas y lingual (15).

CARCINOMA ESCAMOSO DE CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE VPH POSITIVO,

GENERALIDADES

Epidemiología

El cáncer de cavidad oral presentó una incidencia de 354864 casos nuevos en el año 2018 y el cáncer de orofaringe una incidencia de 92887 casos nuevos. La cantidad de muertes en este mismo año debidas a ambos cánceres fue de 228389 casos, representando el 2.4% de las muertes por cáncer de ese año (16). El carcinoma escamoso representa más del 90% de los casos de cáncer de cabeza y cuello y estos suelen surgir de la mucosa de la cavidad oral, orofaringe y laringe (2). En Costa Rica, el cáncer de cavidad oral y orofaringe tuvo una incidencia de 125 casos nuevos, 71 casos de cavidad oral y 54 de orofaringe. La mortalidad en el año 2015 debida a los dos cánceres fue de 65 casos totales, representando el 1.4% de las muertes totales por cáncer ese año (17). Actualmente, no se cuenta a nivel nacional con datos epidemiológicos específicamente para el carcinoma escamoso de estos sitios ni tampoco se cuenta con una base de datos que muestre la información organizada de acuerdo a la asociación o no con el VPH.

Si se observa la incidencia y prevalencia del CECO y del CEOF a nivel mundial durante las últimas décadas, se puede comprobar un considerable aumento en el CEOF y en general una disminución (significativa o no) en el CECO en la población masculina (3,4). Estas tendencias son más notorias en países desarrollados, como los de América del Norte (18–20), Europa occidental (21,22) y nórdica (23,24), Taiwán (25) y Australia (26). Otros cánceres asociados al tabaco como el cáncer de pulmón y de laringe, muestran en general la misma tendencia a la baja en su incidencia que el CECO. Este es el primer indicio de que existe un factor etiológico distinto (VPH) en muchos de los CEOFs (a diferencia del CECO) y que es la infección con este virus la responsable del aumento de esta incidencia. Este dato se ha comprobado en distintos

estudios moleculares de varios países (19,27,28). Además, las tasas de incidencia han sido más altas y han crecido más rápidamente en especial en hombres menores de 60 años. En mujeres también se ha visto un aumento del CEOF, pero este ha incrementado junto con el CECO y el carcinoma de pulmón, a diferencia de los hombres (4). También, el aumento de la incidencia en hombres ha sido en promedio 4 veces mayor que en mujeres (18). Esto sugiere que el fumado y no el VPH es el responsable del aumento de estos tres cánceres en la población femenina e indica un impacto mucho mayor del VPH en la incidencia de CEOF en hombres en contraste con las mujeres (4).

Las razones por las que hay un aumento en la incidencia de la infección del tejido orofaríngeo y amigdalino con el VPH y por ende esta tendencia al aumento de casos del CEOF en las últimas décadas, corresponden principalmente a factores relacionados a las prácticas sexuales. Se ha observado que la práctica de sexo oral es más frecuente en las generaciones más nuevas con respecto a generaciones previas. Esto lo demostró un análisis combinado de estudios de casos y controles del Consorcio Internacional de Epidemiología de Cáncer de Cabeza y Cuello con participantes de 12 países (29). De acuerdo a este análisis, la práctica de sexo oral tanto en hombres como en mujeres aumentó significativamente en las cohortes nacidas más recientemente en comparación con las cohortes nacidas distantemente (15% a 54% en hombres y 13% a 69% en mujeres). Además, esta práctica varía considerablemente de acuerdo a la región geográfica, desde 9% en India a 78% en EEUU (29), lo cual explica por qué en muchos países en vías de desarrollo no se observa este aumento dramático en la incidencia del CEOF en comparación con el CECO. Se ha establecido que la infección de la cavidad oral y orofaringe con el VPH es el principal factor de riesgo para desarrollar el CEOF VPH positivo y que el sexo oral es responsable de más del 90% de las infecciones de cavidad oral y orofaringe por VPH (30). Además, los estudios han demostrado que el factor conductual más fuertemente asociado al carcinoma orofaríngeo es el número de parejas sexuales orales durante la vida (8,29). Otros factores propuestos para el aumento de incidencia, cuyo impacto en esta es probablemente menor son el aumento en la detección de casos por medio de mejoras en métodos de tamizaje como los estudios de imágenes y la disminución considerable en la cantidad de amigdalectomías realizadas, lo cual se ha observado, tiene un impacto en la disminución del cáncer amigdalino de hasta 60% (31,32).

La incidencia continúa aumentando a una tasa de alrededor de 5% cada año (33). En Inglaterra, el cáncer de cabeza y cuello aumentó 58% de 1995 a 2011, más marcadamente para el CEOF y se espera que el CEOF siga aumentando en este país un 239% de 2011 a 2025, llegando a ser el responsable del 35% de todos los cánceres de cabeza y cuello para este año (34).

Diferencias clave del CECOOF VPH positivo con el CECOOF VPH negativo

La gran mayoría del subtipo VPH positivo de estas neoplasias se origina del epitelio de la orofaringe, la cual incluye la base de la lengua, las amígdalas, las fosas amigdalinas, el paladar blando y la pared orofaríngea (12). Menos del 3% de los carcinomas escamosos de cavidad oral (CECO) son VPH positivos (33), por lo que suele equipararse el CECOOF VPH positivo con el carcinoma escamoso orofaríngeo (CEOF) VPH positivo. En el caso del CEOF, la cantidad de casos VPH negativo es variable de acuerdo a la región geográfica y es de alrededor del 20% en EEUU, Canadá y el norte de Europa (33) y se ha reportado de hasta 85% en países como India (35). Por esta razón, no se puede equiparar CEOF con positividad para VPH, ya que 20% o más de casos VPH negativos en esta región es un porcentaje considerable. Así, la positividad para VPH quiere decir prácticamente que se está en la región orofaríngea, pero tener un carcinoma escamoso orofaríngeo no quiere decir necesariamente que este será VPH positivo.

Los subtipos CECOOF VPH positivo y VPH negativo son biológicamente distintos y se comportan clínicamente de manera diferente, de ahí la importancia en su clasificación por aparte. En cuanto a la parte clínica, el CECOOF VPH negativo suele presentarse con mayor frecuencia en el borde lateral y el vientre de la lengua, el piso de la boca, las encías y otras partes de la cavidad oral. El resto se da en el labio y glándulas salivales menores. Se da con mayor frecuencia en hombres (relación hombre: mujer \cong 3:1) mayores de 50 años (edad promedio 62 años). Con frecuencia son precedidas por lesiones premalignas clínicamente visibles como una leucoplaquia, una eritroplaquia o una lesión mixta (eritroleucoplaquia); siendo la eritroplaquia la lesión más asociada a displasia o carcinoma. Estas lesiones evolucionan en úlceras que aumentan de tamaño y que no sanan. La invasión la puede indicar el sangrado, la pérdida de piezas dentales, la disfagia, la disartria, la odinofagia o la presencia de una masa palpable en cuello. Los carcinomas invasores se pueden presentar de forma muy variable, desde lesiones pequeñas y asintomáticas hasta lesiones ulceradas deprimidas o masas fungiformes. La prevalencia de metástasis a ganglios linfáticos regionales es de aproximadamente 40% (33). Estas características clínicas contrastan mucho con las del CEOF VPH positivo, las cuales se analizarán posteriormente.

La multifocalidad y múltiples tumores primarios y la presencia de metástasis al momento de diagnóstico son características clínicas interesantes que contrastan entre los tumores VPH positivos y VPH negativos. Se ha visto que los tumores VPH negativos tienden a tener mayor frecuencia de tumores primarios múltiples o multifocalidad que los VPH negativos (12,36), esto debido a la exposición de todo el revestimiento del tracto aerodigestivo superior a los mismos carcinógenos (tabaco y alcohol) (12). En el caso de las metástasis al momento del diagnóstico, el carcinoma escamoso VPH positivo tiende a

presentarlas con mucho mayor frecuencia que el VPH negativo (80-90% vs 40%) y las presenta a un estadio T menor, o sea cuando el tumor es todavía de pequeño tamaño u oculto (metástasis de primario desconocido); la enfermedad metastásica regional en el subtipo VPH negativo es más bien un indicador de un estadio T avanzado o un tumor grande con un espesor de invasión mayor (33).

Otro comportamiento clínico importante que difiere entre estas dos entidades es el pronóstico. El carcinoma escamoso VPH negativo tiene un peor pronóstico. Si se compara la tasa de supervivencia a 5 años, la del carcinoma escamoso VPH negativo es de 64% en cavidad oral y de 40 a 50% en orofaringe y la del VPH positivo es del 80% (33). A pesar de esto, la supervivencia es ampliamente dependiente del estadio TNM en ambos tipos de carcinomas escamosos (decreciendo sustancialmente con cada aumento de los estadios T y N) (12). Estas diferencias en la supervivencia entre ambos subtipos se dan debido a la radiosensibilidad del carcinoma escamoso VPH positivo, la cual no está presente en el VPH negativo (33).

Biológicamente, también existen diferencias entre el CECOOF VPH negativo y el subtipo VPH positivo. El VPH negativo se asocia al tabaquismo, en especial al consumo de tabaco fumado, el cual aumenta el riesgo de cáncer de 5 a 17 veces. También existe asociación con el consumo de otras formas de tabaco no fumado como el masticado y con el consumo de la nuez de areca en el sureste asiático. El consumo del alcohol tiene un efecto sinérgico con el fumado, aumentando aún más el riesgo de este cáncer. La exposición crónica al sol es un factor de riesgo para el carcinoma escamoso originado en el labio. Hay mutaciones genéticas hereditarias asociadas a este cáncer como lo son la anemia de Fanconi y el síndrome de Li Fraumeni (33). El subtipo VPH positivo se asocia únicamente a la infección de la mucosa orofaríngea por el VPH, asociando todos los factores de riesgo para la adquisición de esta infección: las prácticas sexuales discutidas más adelante.

El carcinoma escamoso VPH positivo y VPH negativo han demostrado tener perfiles similares de alteración en el número de copias cromosómicas, aunque con algunas diferencias únicas. Por ejemplo, la pérdida de 14q32 y de 11q se han visto con mucho mayor frecuencia en los carcinomas escamosos VPH positivos (37). A nivel de mutaciones genéticas específicas, las mutaciones identificadas en ambos subtipos fueron distintas, por ejemplo, el subtipo VPH negativo presenta mutaciones en TP53 (gen mutado con mayor frecuencia), CCND1, PIK3CA, EGFR y amplificaciones de FGFR1 con deleciones de CDKN2A. De manera distinta, los tumores VPH positivos típicamente demostraron amplificaciones y deleciones de PIK3CA y mutaciones en FGFR3 (38). Recientemente se ha propuesto que factores epigenéticos juegan un papel importante en el progreso del carcinoma escamoso. La silenciamiento de genes por la metilación es no solamente un evento temprano en la oncogénesis de ambos tipos de carcinoma escamoso, sino que es

un mecanismo más importante en el desarrollo de esta neoplasia que las mutaciones, amplificaciones y deleciones (12). Otros mecanismos epigenéticos relevantes en la oncogénesis son los perfiles de microARN (39). Tanto en la metilación genética como en los perfiles de microARN se ha demostrado una considerable variabilidad entre los tumores VPH positivos y los VPH negativos (40,41).

A nivel microscópico, la displasia en las lesiones premalignas se caracteriza por desorganización celular, aumento de la actividad mitótica y aumento del tamaño nuclear con pleomorfismo. Esta va desde la displasia leve hasta la displasia severa y el carcinoma in situ, dependiendo del grosor del epitelio comprometido por los cambios previamente descritos, desde los estratos basales a los estratos superficiales. En cuanto al carcinoma invasor (CECOOF VPH negativo), la mayoría de estos corresponden al carcinoma escamoso clásico o convencional, el cual es usualmente de bien a moderadamente diferenciado (grado 1 y grado 2). El carcinoma escamoso bien diferenciado se compone de islas y nidos de epitelio con diferenciación escamosa con células de citoplasma eosinofílico, puentes intercelulares y formación de perlas de queratina, con frecuencia asociados a inflamación. El moderadamente diferenciado presenta mayor atipia, menor grado de maduración y menor grado de queratinización, sin embargo, esta sigue siendo evidente. Otros tipos histológicos menos comunes que han sido descritos (variantes) son el carcinoma escamoso basaloide, el carcinoma de células fusiformes, el carcinoma adenoescamoso, el carcinoma cuniculatum, el carcinoma verrucoso, el carcinoma escamoso papilar, el carcinoma escamoso acantolítico y el carcinoma escamoso linfoepitelial (33). Contrastando con estas características, la falta de queratinización es la característica principal del CECOOF asociado a VPH (42). En cuanto a los marcadores de inmunohistoquímica, la diferencia más relevante entre ambos subtipos es la expresión del marcador sustitutivo p16 en el subtipo VPH positivo y la negatividad de esta prueba en el VPH negativo (42).

Factores de riesgo

Desde hace ya casi 15 años la OMS concluyó por primera vez que el virus del papiloma humano (VPH) serotipo 16 es una causa de carcinoma de cavidad oral y orofaringe (43). Actualmente se cuenta con abundante evidencia patológica y molecular para establecer un vínculo etiológico entre serotipos específicos de VPH y algunos carcinomas de cabeza y cuello, en especial el carcinoma orofaríngeo (44,45). Esta evidencia cumple con los criterios elaborados por el Instituto Nacional del Cáncer de EEUU para la instauración de una relación entre un agente infeccioso carcinogénico y el desarrollo de un tipo de cáncer (46). Estos criterios se componen de evidencia molecular, modelos in vitro y modelos de animales (8).

Dentro de los criterios moleculares no sólo se ha detectado el ADN del VPH por PCR e hibridación in situ en los distintos CECOOFs, sino que también se ha detectado la expresión de la región E6/E7 del ARNm viral en estos tumores en los estudios realizados, los cuales se han enfocado principalmente en el VPH serotipo 16, el cual es el tumor más frecuentemente encontrado en estos tumores con la prueba de PCR (8,47). La detección de manera difusa del ADN viral en las células tumorales mediante hibridación in situ y la demostración de retención del ADN viral en células tumorales cultivadas de cáncer orofaríngeo, son indicadores de que hay clonalidad viral (48–52). Además, se cumplen los criterios de modelos in vitro y modelos en ratones, los cuales demuestran que la expresión de E6/E7 aumenta considerablemente la susceptibilidad al desarrollo de cáncer oral y orofaríngeo y que esta es necesaria para la inmortalización de las células epiteliales y la persistencia del fenotipo maligno en ellas (52–54).

Adicional a la evidencia directa, existe amplia evidencia epidemiológica que establece una asociación causal entre la infección con el VPH y algunos cánceres de cabeza y cuello. Se han utilizado distintas medidas de exposición al VPH en múltiples estudios de casos y controles y de cohorte, entre ellas medidas del comportamiento sexual, serología (anticuerpos contra L1/L2 y E6/E7) y detección de ADN del VPH en células orales exfoliadas (8).

En lo que respecta al riesgo asociado con los indicadores del comportamiento sexual, Gillison et al. menciona 14 estudios de casos y controles, de entre los cuales 8 estudios comprueban una asociación entre al menos una medida de comportamiento sexual y cáncer de cabeza y cuello (8). En 4 de estos 8 estudios esta asociación fue estadísticamente significativa sin hacer especificación de sitio anatómico, en 3 de los 8 se encontraron asociaciones estadísticamente significativas con cáncer orofaríngeo (55) y en 1 de los 8 se encontró asociación con cáncer de cavidad oral (56). En estos mismos estudios, los comportamientos sexuales más consistentemente asociados con el cáncer escamoso de cabeza y cuello incluyeron el número de parejas sexuales genitales y el número de parejas sexuales orales. Otros factores con menor asociación con el cáncer escamoso de cabeza y cuello fueron una menor edad de la primera relación sexual, historia de verrugas genitales o de enfermedades de transmisión sexual, el no uso o el uso infrecuente del condón, contactos sexuales con parejas del mismo sexo y contacto sexual anal-oral o anilingus (55,56). Otro estudio realizado por Heck et al. demostró que el cáncer escamoso de amígdala y de base de lengua aumenta su probabilidad de desarrollarse con una historia de más de 4-6 parejas sexuales orales (factor con asociación más fuerte), historia de haber tenido sexo oral y edad más temprana de inicio de relaciones sexuales (29).

Múltiples estudios serológicos que analizaron la detección de anticuerpos contra el antígeno de cápside viral L1 y/o las oncoproteínas E6/E7 del VPH serotipo 16 demostraron asociación entre los casos seropositivos y el desarrollo de carcinoma escamoso de cabeza y cuello, ya sea a nivel general o a nivel de un sitio anatómico específico (8). Sin embargo, la razón de probabilidades u *odds ratio* (OR) demostró una asociación mucho más fuerte de la seropositividad con el cáncer orofaríngeo que con el cáncer de cavidad oral o laringe, en todos (57–63) excepto en uno de los estudios (64). Esto es consistente con la alta prevalencia de ADN viral y de expresión de oncoproteínas virales E6/E7 en cánceres orofaríngeos en comparación con los de cavidad oral. Otros serotipos virales de alto riesgo también demostraron asociación; los serotipos 31, 33 y 52 con cáncer orofaríngeo (62,64,65), el 35 con cáncer orofaríngeo y cáncer de cabeza y cuello en general (65) y el serotipo 6 con cáncer de cabeza y cuello en general y con varios sitios específicos (64,66). Este último es un serotipo de bajo riesgo, pero su asociación se puede explicar por la coinfección al exponerse a serotipos de alto riesgo. En el caso de la detección de anticuerpos contra las proteínas E6/E7 del VPH 16, el OR fue de hasta 67.1, o sea se demostró un aumento de probabilidad de 67 veces para el desarrollo del carcinoma orofaríngeo al detectar estos anticuerpos (58).

Se han llevado a cabo también, estudios epidemiológicos que han encontrado asociación entre la detección de ADN de VPH en células epiteliales exfoliadas de cavidad oral y el riesgo de cáncer escamoso de cabeza y cuello; 9 de 11 estudios de este tipo reportaron esta asociación (8). La recolección de estas muestras de la cavidad oral y faringe se realizó con hisopado de la fosa amigdalina o con enjuagues de solución salina con o sin cepillado con un cytobrush (67). Al igual que con los estudios serológicos, estos también demostraron mayor asociación de la infección viral con el cáncer orofaríngeo que con los otros cánceres de la cavidad oral u otros sitios anatómicos (8). Interesantemente, uno de los estudios (el más grande) no demostró asociación alguna de la infección con el cáncer de cavidad oral u orofaríngeo, sin embargo, en este estudio tampoco hubo una buena correlación en este estudio entre la detección del virus en las células exfoliadas y los especímenes de biopsia (58).

Además de la infección con el VPH, se han estudiado otros elementos que podrían estar asociados al desarrollo del CECOOF VPH positivo, ya sea como cofactores o actuando de manera sinérgica junto con el VPH para aumentar el riesgo de este cáncer (modificadores de efecto). Los elementos más estudiados son el consumo de tabaco y alcohol (57,61,68,69), la dieta y nutrición (70,71), las variaciones y polimorfismos genéticos (72,73), el uso de marihuana (74) y la mala higiene dental (75). Los estudios que analizaron estas variables mostraron conclusiones contradictorias o no lograron mostrar una asociación fuerte en cada

uno de los elementos estudiados. Debido a esto, se requiere de estudios comprehensivos más grandes para seguir investigando si los factores de riesgo no virales para el carcinoma escamoso de cabeza y cuello pueden comportarse como cofactores o como modificadores de efecto en el riesgo del desarrollo del CEOF VPH positivo.

Manifestaciones clínicas

Los carcinomas escamosos orofaríngeos se presentan en la mayoría de los casos como tumores primarios pequeños que usualmente se originan de las amígdalas palatinas, seguido de la base de la lengua. Estos sitios tumorales tienen una gran cantidad de tejido linfoide asociado con el epitelio invaginado de las criptas, para el cual el VPH es afín. Para el CEOF VPH positivo no se ha encontrado una lesión precursora, posiblemente porque el epitelio de las criptas tiene una membrana basal discontinua que puede ser permisiva para metástasis tempranas. Aproximadamente el 80-90% de los pacientes se presenta con metástasis a ganglios linfáticos regionales. Es incluso frecuente que estos tumores se presenten como un tumor indetectable, o incluso después de una evaluación clínica exhaustiva, sea realmente un cáncer con tumor primario desconocido (33).

Los casos en los que el tumor primario de un CEOF VPH positivo logra alcanzar un tamaño considerable al diagnóstico, lo cual no es una presentación usual, las manifestaciones clínicas dependerán de la región de la orofaringe comprometida. Estas regiones anatómicas son la base de la lengua, la pared orofaríngea propiamente, el paladar blando y las amígdalas palatinas y zona amigdalina circundante. Estas regiones anatómicas son ricas en tejido linfoide, en especial las amígdalas palatinas y la amígdala lingual en la base de la lengua, por lo que son los sitios en los que con mayor frecuencia se encuentra la positividad para VPH en los tumores (12,33).

Base de lengua:

Un carcinoma escamoso en la base de la lengua/amígdala palatina es usualmente VPH positivo y con frecuencia es un carcinoma escamoso no queratinizante y pequeño, el cual se presenta con enfermedad metastásica regional a ganglios cervicales muy aparatosa. El pequeño tamaño tumoral al momento del diagnóstico hace que los síntomas por crecimiento e invasión tumoral como el dolor, la disfagia, el sangrado y la sensación de masa sean poco frecuentes. Esto contrasta con los carcinomas escamosos VPH negativos, los cuales llegan a tener un tamaño considerable antes de ser diagnosticados, con dolor y disfagia siendo los principales síntomas de presentación y con una enfermedad cervical menos prominente (12).

Región amigdalina y paladar blando:

Los tumores en esta área pueden involucrar los pilares amigdalinos anteriores o posteriores, la amígdala propiamente o el paladar blando. Los asociados a VPH se encuentran con mucho mayor frecuencia en la amígdala propiamente y tienden a esconderse entre las criptas amigdalinas, siendo indetectables en el examen físico de la orofaringe. Por esta razón, al igual que en los tumores de base de lengua, el síntoma principal al momento de diagnóstico es la presencia de adenopatías cervicales extensas, usualmente de gran tamaño para el pequeño diámetro del tumor primario. En caso de que el tumor crezca un tamaño considerable, este tiende a invadir profundamente las estructuras y tejidos subyacentes o extenderse a la base de la lengua o la pared faríngea, en cuyo caso aparecerían los síntomas de disfagia y dolor. Además, es frecuente que esta invasión profunda local se acompañe de una invasión más superficial pero extensa a lo largo de la submucosa en dirección craneal hacia la nasofaringe, lo cual puede no ser reconocido en la estadificación tumoral preoperatoria, dándole una estadificación preoperatoria menor a la real. Los tumores de los pilares amigdalinos y del paladar blando cuando logran alcanzar tamaños grandes, tienden a crecer de manera más superficial, sin invadir profundamente, abarcando áreas mucosas extensas sin penetración profunda (12).

Pared orofaríngea:

El carcinoma escamoso de esta zona es menos frecuente que presente positividad para VPH en comparación con los tejidos amigdalinos de la base de lengua y la amígdala palatina, en cuyo caso las manifestaciones clínicas de enfermedad cervical extensa con un tumor primario pequeño se mantienen. En casos avanzados, los tumores se pueden extender cranealmente a la nasofaringe, posteriormente hacia la fascia prevertebral o caudalmente a la hipofaringe y los senos piriformes (12).

Características radiológicas

La evaluación radiológica es principalmente utilizada para propósitos de estadificación. Las técnicas ocasionalmente empleadas son la tomografía computarizada, la resonancia magnética y la tomografía con emisión de positrones. Estas se utilizan para determinar la extensión de la invasión local y la presencia de diseminación metastásica a ganglios linfáticos regionales (cervicales) o a distancia. No existen hallazgos radiológicos distintivos para el CEOF primario, sin embargo, las metástasis ganglionares cervicales son característicamente quísticas, con paredes delgadas y material necrótico o fluido en el centro. Más del 90% de los pacientes presenta metástasis a los ganglios del nivel II del cuello (33).

Características Patológicas Macroscópicas y Microscópicas

Características macroscópicas:

La apariencia de estas lesiones escamosas varía de un engrosamiento sutil blanquecino grisáceo de la mucosa a masas grandes, ulceradas, planas o fungiformes con invasión de estructuras locales. Dependiendo del grado de desmoplasia y de necrosis tumoral, la superficie de corte de los tumores invasores puede ser blanda, sólida/firme o quística y friable (33).

Características microscópicas:

El CEOF VPH positivo, usualmente no involucra la superficie mucosa, es decir, no se encuentran las lesiones precursoras de displasia de bajo y alto grado en el epitelio inmediatamente cercano al tumor; más bien, las lesiones tempranas invasoras aparentan originarse y ser continuas con el epitelio de la cripta amigdalina (amígdala palatina o lingual que son los sitios más frecuentes de aparición). Estas lesiones podrían parecer carcinoma in situ, sin embargo, no deben catalogarse como tal porque la membrana basal de las criptas es discontinua y es una barrera poco efectiva para detener la diseminación tumoral (33).

Estos tumores adoptan una morfología de “células azules” (alta relación núcleo-citoplasma) en 65 a 80% de los pacientes. Los núcleos son ovales, grandes e hiper cromáticos, el citoplasma es escaso y en la gran mayoría de los casos, no hay formación de queratina (carcinoma escamoso no queratinizante) y como se mencionó anteriormente, no se observa cambios displásicos en el epitelio. Este tipo presenta nidos grandes con contornos lisos, con escasa reacción estromal (desmoplasia) y con maduración escamosa ausente o limitada, la cual se encuentra en la periferia tumoral cuando está presente. La actividad mitótica es marcada (33). A pesar de que estas características denotan un tumor menos diferenciado que el clásico queratinizante VPH negativo, el pronóstico es más favorable y es por esta razón que el CEOF VPH positivo no se debe graduar histológicamente (42).

Existen variantes morfológicas del CEOF que pueden presentarse tanto en el VPH positivo como en el VPH negativo y que se alejan de la morfología usual, que en el caso de un CEOF VPH positivo sería la descrita previamente. Estas se discutirán a continuación.

Carcinoma escamoso papilar: es común en la orofaringe y se caracteriza por papila exofíticas prominentes con tallos fibrovasculares delicados. A diferencia de los papilomas escamosos benignos, las frondas papilares de este carcinoma están revestidas por células escamosas francamente malignas. Usualmente hay un componente invasor notorio y aproximadamente el 80 % son VPH positivos (33).

Carcinoma escamoso basaloide: es también relativamente común en la orofaringe. Es caracterizado por lóbulos con crecimiento expansivo, compuestos por células hipercromáticas, redondeadas y basaloideas. Estos nidos se amoldan uno con otro, separados entre sí solamente por una franja delgada de estroma, presentando un patrón que se describe como “en rompecabezas”. Este tumor presenta también un estroma nodular hialinizado y únicamente áreas focales de diferenciación escamosa madura. Aproximadamente 75 a 80% son VPH positivos y cuando lo son, tienen un pronóstico muy favorable. El carcinoma escamoso basaloide VPH negativo es, por el contrario, extremadamente agresivo con altas tasas de enfermedad metastásica (33).

Carcinoma de células fusiformes (fusocelular o sarcomatoide): es muy poco común en la orofaringe. Clásicamente se presenta como una masa exofítica, lobulada, que histológicamente se caracteriza por sábanas de células fusiformes con pleomorfismo marcado, usualmente entremezcladas con un componente invasor típico de carcinoma escamoso. Rara vez es VPH positivo (33).

Carcinoma adenoescamoso: es poco común en la orofaringe y se define por la presencia de un componente de carcinoma escamoso entremezclado con glándulas verdaderas redondeadas que usualmente, pero no siempre, se asocian con producción de mucina. Se han reportado muchos carcinomas adenoescamosos VPH positivos, los cuales pueden tener células tumorales con cilios apicales, lo cual imita un proceso benigno. En general, tiene peor pronóstico que el carcinoma escamoso queratinizante, pero en los casos VPH positivos, el pronóstico es favorable (33).

Carcinoma similar a linfopitelial (indiferenciado): corresponde únicamente al 3% de los carcinomas orofaríngeos y morfológicamente es indistinguible del mismo tumor en la nasofaringe (carcinoma nasofaríngeo). Histológicamente, tiene agregados de células tumorales pobremente definidos, con bordes mal definidos, células con núcleo redondeado con nucléolos prominentes y un infiltrado linfoplasmocítico denso. En casi la totalidad de los casos es VPH positivo (95-100% de los casos) en la orofaringe y tiene un muy buen pronóstico (33). En esta región anatómica, este tumor no se asocia a virus Epstein-Barr (VEB) (76).

En cuanto a la histopatología de los depósitos metastásicos, el cambio quístico es un hallazgo común, en especial si este cambio es marcado, con paredes quísticas delgadas. El tumor metastásico es de apariencia no queratinizante, al igual que el tumor primario. El revestimiento interno de la lesión quística puede variar desde delgado con una sola capa de células con escaso pleomorfismo hasta muy grueso y estratificado con células hipercromáticas, anguladas, superpuestas y pleomórficas, con nidos tumorales

en el tejido nodal adyacentes. Además, estas metástasis quísticas se ha demostrado que con frecuencia pueden tener formación de glándulas verdaderas con producción de mucina, revestidas de epitelio cilíndrico e incluso en algunos casos estas células presentan cilios apicales. Es por esta razón que estas lesiones se pueden confundir con un quiste de la hendidura branquial o con un carcinoma originado en un quiste branquial (muy raros) y la inmunohistoquímica para p16 y la hibridación in situ para VPH de alto riesgo son muy útiles en el diagnóstico. (42,76).

Diagnóstico

Al presentarse al momento del diagnóstico enfermedad metastásica cervical en 80-90% de los pacientes con CEOF VPH positivo, la biopsia por aspiración con aguja fina (BAAF) en un método efectivo para establecer diagnóstico de carcinoma escamoso metastásico. Los extendidos citológicos de estas lesiones metastásicas muestran sábanas y conglomerados de células con alta relación núcleo-citoplasma, nucléolos inconspicuos, muy escasas células únicas, núcleos hipercromáticos que se traslapan y un fondo de contenido de quiste y/o detritos necróticos. Si el ganglio es quístico (mayoría de los casos), se recomienda tomar contenido de quiste, pero se debe intentar tomar muestra de la porción más sólida de la pared. Se recomienda también tomar material para la preparación de un bloque celular, en el cual se puede realizar inmunohistoquímica para p16 e hibridación in situ cromogénica (CISH) para VPH de alto riesgo. También se puede hacer la detección de ADN del virus en medio líquido. La positividad de estas pruebas confirmaría que es un carcinoma escamoso asociado a VPH de probable origen orofaríngeo (33).

En la biopsia de la lesión primaria se pueden realizar otras pruebas de inmunohistoquímica. Estas son útiles, pero raramente necesarias; su utilidad se da principalmente para excluir un carcinoma de células pequeñas o un linfoma. El CEOF VPH positivo presenta positividad para CKAE1/AE3, CK34 β E12, CK5/6 y p63/p40 (patrón difuso) y es negativo para marcadores linfoides, melanocíticos y neuroendocrinos. El p16 es una proteína supresora tumoral que se sobreexpresa de forma aberrante en los CEOF VPH positivos, de ahí su utilidad como un marcador sustitutivo para indicar infección por el VPH de alto riesgo. Este se expresa de manera fuerte y difusa tanto en núcleo como en citoplasma (33,42). Es obligatorio realizar el p16 de rutina a todos los CEOF, ya que su positividad tiene una significancia pronóstica muy importante y se requiere para realizar la correcta estadificación de la 8ª edición de la AJCC (6,33). Como prueba alternativa o complementaria, se puede realizar el CISH para VPH de alto riesgo, el cual debe ser también positivo (33,42).

El diagnóstico diferencial del CEOF VPH positivo es con otros tumores de células azules, ya que la presentación usual este tumor es la descrita anteriormente caracterizada por células azules y ausencia de queratinización o maduración escamosa. Podría confundirse con un carcinoma de células pequeñas, un carcinoma adenoide quístico o un linfoma. En este contexto, la inmunohistoquímica puede ser muy útil para establecer el diagnóstico de carcinoma demostrando positividad para las citoqueratinas de alto peso molecular, el p40 (en patrón difuso) y ausencia de marcación para marcadores neuroendocrinos y linfoides (33).

Pronóstico y Tratamiento

El CEOF tiene dos tipos pronósticos distintos, el VPH positivo y el VPH negativo. La sobreexpresión de p16 es un marcador sustitutivo efectivo para la presencia de infección o no con VPH de alto riesgo. Este es un marcador pronóstico muy importante como test individual. Debe ser realizado en todos los especímenes nuevos de carcinoma escamoso orofaríngeo (33).

Como fue explicado anteriormente, la supervivencia a 5 años del CEOF VPH positivo (p16 positivo) es de aproximadamente 80%, comparado con un 40-50% para el VPH negativo (p16 negativo) (33); de aquí la importancia de recalcar de nuevo la recomendación de realizar el p16 a todos los carcinomas escamosos de orofaringe.

Las opciones de tratamiento disponibles son muy variables y dependen de muchos factores, incluyendo el tamaño y localización del tumor primario, la presencia de metástasis a ganglios linfáticos regionales, la presencia de metástasis a distancia y la habilidad del paciente para tolerar el tratamiento. La radiación y quimioterapia primarias son muy efectivas en los tumores VPH positivos porque estos son muy sensibles. Sin embargo, hay un papel cada vez más importante de la cirugía primaria debido al desarrollo de abordajes transorales como la cirugía láser o robótica, particularmente para los estadios tempranos de CEOF y para los tumores primarios pequeños, acompañados de radioterapia adyuvante (con o sin quimioterapia), dependiendo de los hallazgos patológicos (33).

El tratamiento de elección es usualmente la combinación de cirugía y radioterapia. Como el CEOF VPH positivo tiene una alta frecuencia de metástasis a ganglios cervicales (de hasta 70% para los tumores T1), en el tratamiento quirúrgico debe llevarse a cabo la disección ganglionar de cuello (77). En un meta análisis reciente se demostró que la radiación combinada con la disección de cuello es el método preferido para tratar a estos pacientes (78). Las metástasis a cuello usualmente se ubican en los ganglios cervicales

superiores y medios y en hasta 20-30% de los casos ocurre metástasis a ganglios contralaterales o metástasis bilaterales (79).

Para casos de enfermedad avanzada, recurrente, irresecable y/o metastásica de CECOOF, están surgiendo opciones de inmunoterapia con Pembrolizumab y Cetuximab, basadas en ensayos clínicos recientes (80,81).

Estadificación

La 8ª edición del Manual para la Estadificación del Cáncer de la AJCC mostró cambios considerables en el sistema de estadificación del cáncer de cavidad oral y orofaringe con respecto a la 7ª edición del año 2010. Este nuevo sistema empezó a implementarse el 1 de enero de 2018. En cuanto al carcinoma escamoso de cavidad oral, el cual es en la gran mayoría de los casos VPH negativo y asociado al fumado, se incluyeron características como la profundidad de invasión tumoral y la presencia de extensión extranodal (no contempladas en la edición previa) y se redefinieron algunos parámetros para establecer el T (invasión tumoral). En cuanto al cáncer orofaríngeo, el cambio más importante fue la inclusión del estado de p16 para así utilizar dos distintos sistemas de estadificación, los cuales varían tanto en el T (invasión tumoral) como en el N (ganglios linfáticos regionales) (6).

El comportamiento tan distinto entre el CEOF VPH positivo (p16 positivo) y VPH negativo (p16 negativo) evidenció que partes del sistema de estadificación de la 7ª edición de la AJCC fuera inefectivo, en especial en lo que respecta a las metástasis ganglionares. Como los casos p16 positivos han aumentado en las últimas décadas, se pudo analizar que estos casos que se diagnosticaron como estadios avanzados debido a las metástasis ganglionares, tenían un pronóstico mucho más favorable que su contraparte p16 negativa, sin importar el estado ganglionar. También se observó una alta tasa de casos con un tumor primario oculto en el contexto de una masa cervical aislada con metástasis p16 positiva y se demostró además que el número de ganglios linfáticos obtenidos en patología a través de la disección ganglionar es una métrica valiosa para la estadificación del CEOF p16 positivo. Todas estas observaciones, junto con otras, fueron las que llevaron a la propuesta de un sistema de estadificación separado, tanto clínico como patológico para el CEOF VPH positivo (13). Los cambios de la 7ª a la 8ª edición se resumen en la tabla 1.

En el caso de la extensión extranodal (EEN), la nueva edición dice que es relevante reportarla únicamente en los casos de CEOF y CEOF VPH negativos, ya que la evidencia no demuestra que la EEN empeore el pronóstico en el CEOF VPH positivo cuando este es tratado apropiadamente (13). En el caso de los tumores VPH negativos, la EEN es relevante reportarla y su reporte como positiva o negativa varía si la región

anatómica es la cavidad oral o la orofaringe. Así, en orofaringe se considera positiva si hay presencia de tumor fuera de la cápsula del ganglio tanto de forma macroscópica (>2mm) como microscópica (≤2mm), pero en cavidad oral sólo se considera positiva si el depósito es macroscópico (>2mm) (6).

Cambio	7ª Ed. (2010)	8ª Ed. (2017)		
		Cavidad Oral	Orofaringe (p16 negativo)	Orofaringe (p16 positivo)
Clasificación T	<p>TX: no se puede evaluar el tumor primario.</p> <p>T0: sin evidencia de tumor primario.</p> <p>Tis: carcinoma in situ.</p> <p>T1: tamaño ≤2 cm.</p> <p>T2: tamaño 2-4cm</p> <p>T3: tamaño >4 cm o con extensión a la superficie lingual de la epiglotis.</p> <p>T4:</p> <p>T4a: enfermedad moderadamente avanzada (compromiso de músculos extrínsecos de la lengua)</p> <p>T4b: enfermedad muy avanzada</p>	<p>T1: tamaño ≤2 cm y profundidad de invasión ≤5mm.</p> <p>T2: tamaño ≤2 cm y profundidad de invasión de 5-10 mm o tamaño de 2-4 cm y profundidad de invasión ≤10 mm.</p> <p>T3: tamaño >4cm o cualquier tamaño con profundidad de invasión >10 mm.</p>	<p>T0: si p16 (+) comprobado sin evidencia de tumor primario.</p> <p>Toda enfermedad local avanzada combinada hasta</p> <p>T4.</p>	
Clasificación N	<p>NX: no se puede evaluar el compromiso de ganglios linfáticos regionales.</p> <p>N0: sin evidencia de compromiso de ganglios linfáticos regionales.</p> <p>N1: metástasis ganglionar ipsilateral única ≤3 cm de tamaño.</p> <p>N2:</p> <p>N2a: metástasis ganglionar ipsilateral única 3-6 cm de tamaño.</p> <p>N2b: múltiples metástasis ganglionares ipsilaterales, todas ≤6 cm de tamaño.</p> <p>N2c: cualquier metástasis ganglionar bilateral o contralateral, todas ≤6 cm de tamaño.</p> <p>N3: cualquier metástasis ganglionar >6cm de tamaño.</p>	<p>Clínica:</p> <p>N0-N2: igual a previa y EEN (-).</p> <p>N3: ahora con subcategorías</p> <p>N3a: N3 previo (tamaño >6cm) y EEN (-).</p> <p>N3b: cualquier tamaño con EEN (+).</p> <p>Patológica:</p> <p>Criterios para EEN patológica (+):</p> <p>Cavidad oral: sólo macroscópica (>2mm)</p> <p>Orofaringe: micro (≤2mm) o macroscópica (>2mm).</p> <p>N1-2: igual a previa y EEN (-).</p> <p>N2a: incluye ganglio linfático ≤3 cm, con EEN (+)</p> <p>N3: ahora con subcategorías:</p> <p>N3a: es N3 previa (tamaño >6cm) y EEN (-).</p> <p>N3b: ≥3cm y EEN (+) o más de 1 ganglio con EEN (+).</p>	<p>Clínica:</p> <p>N1, N2a y N2b previos se combinan en N1 (≤6cm con o sin EEN)</p> <p>El N2c previo es N2 (≤6cm con o sin EEN)</p> <p>Patológica:</p> <p>Estatus de EEN no se incorpora</p> <p>N1: <4 ganglios linfáticos involucrados</p> <p>N2: >4 ganglios linfáticos involucrados</p>	
Grupo de Estadío TNM	Estadificación clínica o patológica utilizada para sistema de organización	Igual a clasificación previa	Grupos separados para estadificación clínica y patológica	

Tabla 1. Comparación de la estadificación del CECO y CEOF entre la 7ª y 8ª edición de la AJCC. (14)

Es importante recalcar que la estadificación del CEOF VPH positivo (p16 positivo) tiene un estadio TNM clínico y patológico separado y que este no toma en cuenta la EEN. El estadio clínico I se expandió para

incluir T0-T2 con cN0-N1, mientras que T3 o cN2 aumentaría el estadio clínico a II y T4 o cN3 aumentaría el estadio clínico a III. En cuanto al estadio patológico, el cambio es similar; T0-T2 con pN0-N1 es considerado estadio patológico I, mientras que el estadio patológico II se acomodó para incluir T3-T4 con pN0-N1 y T0-T2 con pN2. El estadio IV, tanto clínico como patológico sólo se determina por la presencia de metástasis a distancia (M1) y el parámetro patológico pN3 ya no existe (6). Estas características se resumen en la figura 4.

A pesar de estos cambios, las guías de tratamiento relacionadas al estadio final aún no se han modificado. Un ejemplo de guías de tratamiento bien conocidas y basadas en evidencia son las Guías de la NCCN (nccn.org). El CEOF de estadio temprano puede ser tratado con cirugía abierta o transoral (cirugía robótica transoral, microcirugía láser transoral) o solamente con radioterapia, mientras que la enfermedad avanzada (estadios III y IV) el estándar es la modalidad combinada de cirugía más radioterapia (con o sin quimioterapia) (82,83).

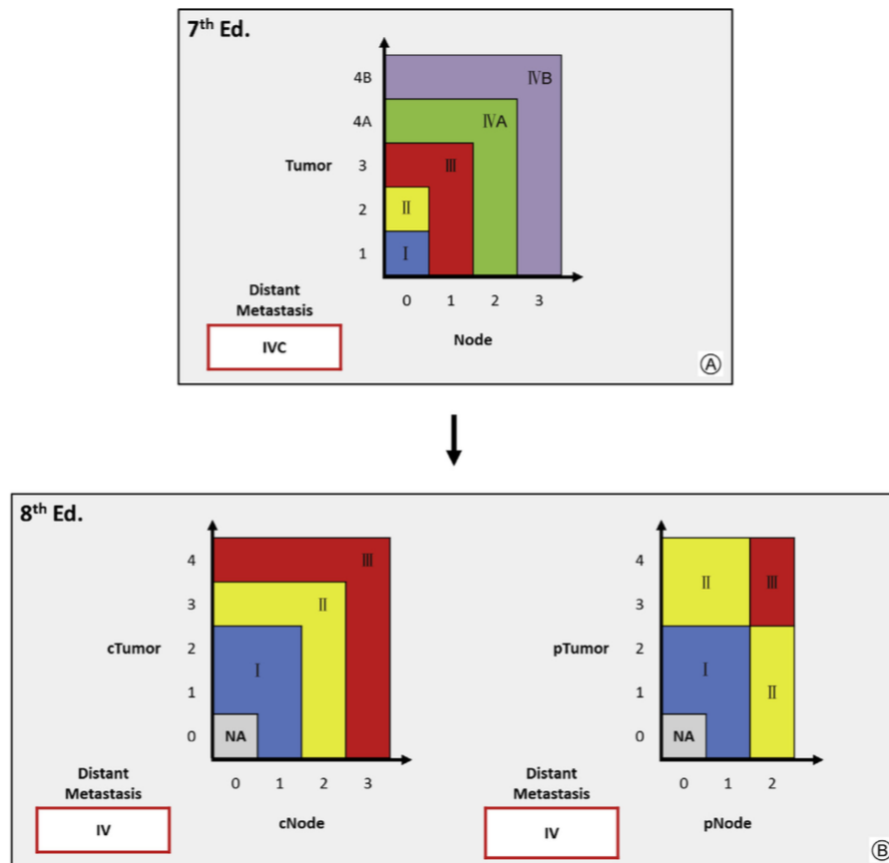


Figura 4. Estadificación basada en la nueva organización del estadio TNM del CEOF p16 positivo. **A:** Organización de la estadificación de la 7^a edición para CEO y CEOF combinadas. **B:** La organización de la

estadificación de la 8ª edición para el CEOF p16 positivo es separada para el estadio clínico y patológico, mostrando una expansión de la categorización temprana para incluir características tumorales clásicamente consideradas como avanzadas. (14)

PROCESAMIENTO DE BIOPSIAS DE CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE

El procesamiento de la biopsia dependerá ampliamente del tipo de biopsia que se tome. Así, se pueden recibir muestras de punciones con aguja fina de un ganglio linfático cervical, muestras de tejido de un ganglio linfático cervical tomado con biopsia con aguja gruesa, una masa quística cervical reseçada por completo, una disección ganglionar completa de cuello uni o bilateral, una muestra pequeña de una lesión orofaríngea, una resección completa de la lesión orofaríngea o una resección de alguna estructura orofaríngea comprometida por la lesión como lo son las amígdalas.

En el caso de una muestra obtenida por BAAF, se debe realizar el extendido de la muestra sobre un portaobjetos, posteriormente se deja secar al aire o se fija inmediatamente en alcohol. Se pueden utilizar químicos fijadores como la solución de Carnoy, el cual remueve la sangre del extendido. Posteriormente, la lámina se puede teñir con hematoxilina-eosina, Papanicolaou o tinción de Romanowsky (84).

En casos de recibir muestras de tejido para biopsia (biopsia con aguja gruesa, resecciones), se debe realizar la descripción macroscópica de la muestra recibida, su corte (si lo requiere) y su inclusión en cassettes o cápsulas. En este paso hay que prestar especial atención a las amígdalas, ya que debido al tamaño pequeño de los CEOFs VPH positivos, puede que no se aprecie ninguna lesión macroscópica en el órgano. En este caso se debe cortar el espécimen de forma seriada a través del eje corto y debe incluirse por completo (42).

Después de la inclusión, una serie de procesos físicos y químicos deben llevarse a cabo para que las laminillas histológicas sean adecuadas para la valoración por un patólogo. La calidad de preservación de la estructura histológica es determinada por los tiempos de exposición a los distintos agentes químicos durante su procesamiento y la calidad de la tinción la da la calidad de los agentes pigmentantes utilizados, el tiempo de exposición a ellos y el seguimiento del orden establecido de los pasos (84). Las etapas de procesamiento del tejido son:

a) Fijación: estabiliza y endurece el tejido con distorsión mínima celular. El agente fijador más utilizado en tejido es la formalina buferizada al 10% y en citopatología es el alcohol etílico.

b) Deshidratación: remoción del agua y fijador del tejido.

- c) Aclaramiento: remoción de soluciones deshidratantes, haciendo el tejido receptivo al medio infiltrante.
- d) Infiltración: permeación del tejido con un medio de soporte.
- e) Incrustación: orientación del tejido en un medio de soporte, donde solidificará y permitirá su corte con un micrótopo.
- f) Tinción: utilización de diferentes agentes colorantes para dar distintas tonalidades de color a las distintas estructuras de la lámina de tejido. La tinción estándar para laminillas histológicas para el diagnóstico de rutina en anatomía patológica es la hematoxilina-eosina (84).

ONCOGÉNESIS DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CAVIDAD Y OROFARINGE VPH POSITIVO

Generalidades del Virus del Papiloma Humano

El VPH es un virus ADN, no envuelto, epiteliotrópico que mide aproximadamente 55 nm de diámetro y lleva consigo una única molécula de ADN circular de doble cadena, con aproximadamente 8000 pares de bases nitrogenadas (85). El genoma consiste de tres regiones las cuales son la región de control largo (*long control region* o LCR), la región temprana (*early* o E) y la región tardía (*late* o L). La región E posee 8 genes (E1 a E8) y la región L posee 2 genes (L1 y L2). Estos genes codifican para proteínas virales mientras que LCR es una región hacia el extremo 5' del ADN, la cual no es codificante y se encarga más bien de regular la replicación y la transcripción del ADN, ya que contiene el origen de replicación, elementos amplificadores o *enhancer* y la región promotora temprana (p97). (Ver figura 5)

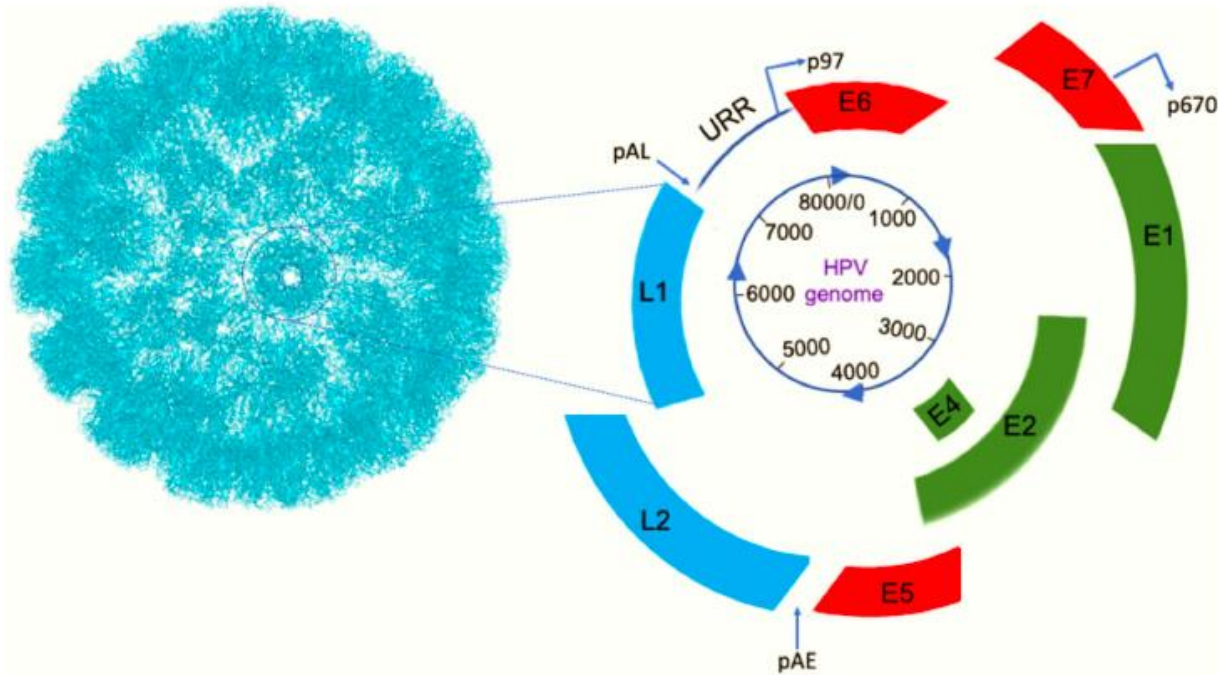


Figura 5. Diagrama esquemático del genoma del VPH 16 y sus proteínas de la cápside. **Imagen derecha:** genes que codifican para las proteínas tempranas (E1, E2, E4, E5, E6 y E7) están mostradas en colores rojo y verde; E5, E6 y E7 son oncogenes. Los genes que codifican para las proteínas tardías (proteínas de la cápside L1 y L2) se muestran en color azul claro. **Imagen izquierda:** la proteína L1 forma pentámeros (uno de ellos está dentro de un círculo) y cada pentámero tiene una proteína L2 en su centro (no mostrado). 72 copias de pentámeros se ensamblan para formar una cápside icosaédrica. (86)

Al día de hoy, se han identificado más de 200 genotipos distintos de Papillomaviridae, los cuales difieren entre sí en al menos 10% de los nucleótidos en el gen de la cápside (L1) (87,88). Estos se pueden clasificar de acuerdo a sus similitudes en las secuencias de ADN. También se pueden clasificar en tipos mucosos (género alfa) y tipos cutáneos (género beta) basado en el tropismo por epitelios específicos y se pueden clasificar en tipos de alto y bajo riesgo según su capacidad para promover transformación maligna en las células hospedadas. Ejemplos de virus de alto riesgo son el VPH 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 45, 51 y 52, que son detectables en lesiones escamosas intraepiteliales de alto grado o cáncer invasor de cérvix y de otros sitios anatómicos; ejemplos de virus de bajo riesgo oncogénico son el VPH 6, 11, 40, 42, 43 y 44, que pueden ser aislados de lesiones intraepiteliales de bajo grado de cérvix y en otro tipo de lesiones como las verrugas genitales. El VPH es uno de los carcinógenos humanos más poderosos. Los genes E6 y E7 producen las oncoproteínas E6 y E7 y son estas las que le confieren al virus su potencial oncogénico, a través de los efectos inhibitorios en las proteínas p53 y retinoblastoma (Rb) (89).

Mecanismo carcinogénico del VPH

El modelo para el desarrollo del carcinoma escamoso involucra la exposición a carcinógenos a lo largo del tiempo, llevando a cambios genéticos y epigenéticos que se acumulan y llevan a lesiones premalignas y eventualmente a lesiones malignas. Sin embargo, el CECOOF es una enfermedad heterogénea con dos subtipos principales (VPH positivo y VPH negativo) y múltiples variantes histopatológicas, lo cual implica que no hay una sola alteración genética que ocurre en todos los CECOOF, sino que se ha demostrado un extenso número de alteraciones genéticas diversas, ya demostradas en estudios de secuenciación profunda. A pesar de esta gran cantidad de alteraciones, la mayoría convergen en cuatro vías moleculares (90):

1. Regulación a la alta o amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y de la vía de la fosfoinositol 3-quinasa (PI3K)/mTOR e inactivación de PTEN. Esto lleva a alteraciones en la proliferación, la reparación del ADN, la supervivencia celular y a la ganancia de potencial de diseminación.
2. Diferenciación defectiva involucrando alteraciones de la señalización NOTCH.
3. Desregulación del ciclo celular con inactivación de del gen supresor tumoral de la quinasa dependiente de ciclina 2A (CDK2A) y amplificación del gen CCND1 (que codifica la ciclina D1).
4. Pérdida de p53 que lleva a inestabilidad genómica; esta ocurre en un amplio porcentaje de los CEOF asociados a VPH. También es el evento mutacional más común.

La tasa de mutaciones en los tumores VPH positivos es aproximadamente la mitad de los tumores VPH negativos, de ahí sus características particulares. Utilizando estudios con cáncer de cuello uterino, se ha observado que en el epitelio cervical los genomas virales se mantienen como episomas (unidad extracromosómica replicante que funciona autónomamente) en las células epiteliales de la capa basal, con una expresión viral fuertemente controlada conforme las células infectadas se mueven hacia la superficie (91). La displasia de alto grado que sigue posteriormente en la vía oncogénica, representa una infección abortiva, en la cual la expresión genética viral se desregula y el ciclo de vida normal del virus no se completa.

Se entiende también de los modelos de cuello uterino estudiados que la mayoría de infecciones por VPH no duran más de unos cuantos meses y son eliminadas por el sistema inmunológico, con 90% de las infecciones aclaradas en 2 años, sin embargo, las infecciones por VPH de alto riesgo persisten más que las de bajo riesgo (92). Por consiguiente, para que haya oncogénesis debe haber infección persistente con

VPH y esto se da solamente si el virus logra evadir la respuesta inmune del hospedero. Posterior a la evasión del sistema inmune, ocurre la integración del ADN del VPH en el genoma de las células del hospedero, esto es un paso crítico para que se de la transformación maligna de estas células. (Ver figura 6) Se cree que esta integración es un proceso aleatorio que resulta en la selección de células que se expanden agresivamente y que muestran una expresión genética alterada de los genomas integrados del VPH y perturbaciones potenciales de genes celulares en o cerca de los sitios de integración viral (93). Adicionalmente, se ha demostrado que esta integración del ADN viral está consistentemente centrada en el epitelio amigdalino (15). A pesar de esto, aún se desconoce los factores que permiten la transformación de una infección episomal por VPH (activa o latente) a una integración del ADN viral al genoma del hospedero.

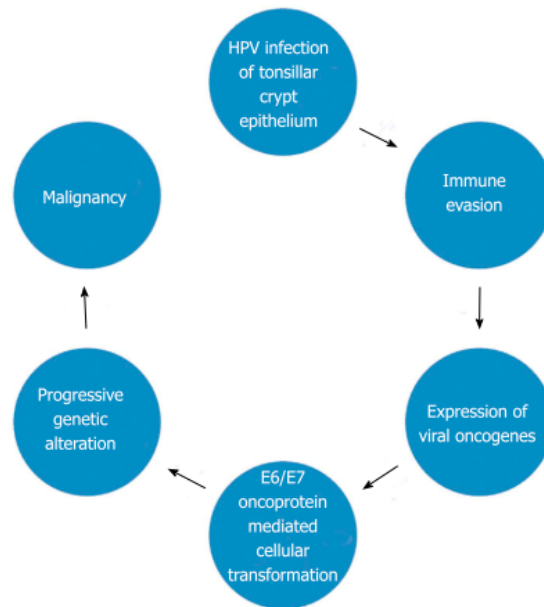


Figura 6. Teoría propuesta sobre la carcinogénesis del VPH en humanos. (90)

El CEOF VPH positivo se presenta con perfiles moleculares particulares que son más similares al carcinoma escamoso de cérvix que al CECOOF VPH negativo (90). Las oncoproteínas virales (de VPH de alto riesgo) E6 y E7, de 151 y 98 aminoácidos respectivamente, actúan como moléculas que dirigen la transformación al CEOF VPH positivo, particularmente el VPH 16. Estas proteínas ayudan a reprogramar las células epiteliales diferenciadas terminalmente para que vuelvan a entrar en el ciclo celular y que expresen proteínas requeridas para la replicación viral (94), además de alterar muchos mecanismos celulares a través de muchos efectos debajo de la cascada de esta vía.

El papel principal de la oncoproteína E6 es la inducción de la proteólisis mediada por ubiquitina, llevando a la degradación de la proteína supresora tumoral p53 (89). Como p53 usualmente facilita la reparación del ADN dañado deteniendo el ciclo celular en la fase G1 o induciendo la apoptosis. Las células con expresión de E6 muestran mayor tasa mitótica e inestabilidad genómica. E6 también ayuda a la proliferación estimulando la expresión de TERT (transcriptasa reversa de la telomerasa), una subunidad catalítica de telomerasa (89).

La oncoproteína E7 causa alteración del ciclo celular al unirse con e inactivar proteínas supresoras tumorales de la familia de retinoblastoma (pRb), las cuales regulan la senescencia celular. Esta proteína (E7) se une a pRb y desplaza los factores de transcripción E2F normalmente secuestrados por Rb, ocasionando su sobreexpresión y por ende activando progresión del ciclo celular acelerando la entrada a la fase S desde la fase G1 (89,95). Esta inactivación funcional de pRb resulta también en una sobreexpresión de la proteína supresora tumoral p16, la cual es un inhibidor de CDK4A, lo que permite su uso como un marcador sustitutivo para la oncogénesis relacionada a VPH (96). La proteína E7 también interacciona con deacetilasas de histonas, ciclinas E y A (activación) y con los inhibidores de la quinasa dependiente de ciclina p21 y p27 (inactivación), todo esto alterando aún más el control del ciclo celular (89).

Los modelos en animales sugieren que la proteína E7 es la oncoproteína dominante del VPH en el CEOF, pero tanto la E6 como la E7 impactan directamente en: mecanismos apoptóticos, interacción con proteínas de adhesión de la matriz extracelular para permitir un crecimiento independiente, interacción con receptores de superficie celular para resistir la apoptosis mediada por citoquinas e interacción con proteínas de señalización del interferón e interleuquinas para la evasión del sistema inmune (90). De todo esto se puede concluir que E6 y E7 son oncoproteínas complementarias a la hora de inducir inestabilidad genómica y mutaciones cromosómicas. Es importante recalcar también que las proteínas E6 y E7 expresadas en los VPH de bajo riesgo no inducen los mismos cambios que las de los del VPH de alto riesgo, esto por su menor afinidad con las proteínas de las células hospederas (89).

MÉTODOS DE DETECCIÓN DEL VIRUS Y MARCADORES SUSTITUTIVOS DE MÉTODOS

DIRECTOS

Las pruebas moleculares tanto en tejido fijado en formalina e incluido en parafina como en material aspirado con aguja fina fijado en alcohol, son necesarias para hacer el diagnóstico definitivo y clasificar adecuadamente un CEOOF como VPH positivo, ya que las características clínicas, radiológicas e

histopatológicas explicadas previamente son sugestivas de que la neoplasia está asociada a este virus, pero no son específicas. Dada la importancia pronóstica de la clasificación como VPH positivo o negativo, se requiere de una prueba auxiliar lo suficientemente específica para clasificar adecuadamente al tumor y lo suficientemente sensible, fácil de realizar y de un costo prudencial para poder ser aplicada de manera rutinaria en el contexto clínico. Así, varias pruebas existentes se pueden utilizar y estas difieren en sensibilidad, especificidad, costo y aplicabilidad en el contexto clínico, haciendo a unas más útiles que otras. A continuación, se analizarán las distintas pruebas existentes para la detección del VPH en el CECOOF.

Marcadores sustitutos de métodos directos, IHQ para p16

Esta prueba consiste en marcar anticuerpos contra la proteína p16 con cromógenos que permiten la visualización a la microscopía óptica de la reacción antígeno-anticuerpo entre p16 y este anticuerpo marcado. La explicación molecular de por qué esta prueba se puede utilizar como un marcador sustitutivo para la detección de VPH es que la proteína p16, la cual es una proteína supresora tumoral que inhibe a la CDKN2A (desacelerando la progresión del ciclo celular), se sobreexpresa como mecanismo de retroalimentación negativa ante la unión de la pRb con la oncoproteína E7 del VPH que causa la disociación del E2F y la progresión del ciclo celular. Esto hace que la sobreexpresión de p16 sea altamente sensible para la infección con VPH de alto riesgo, ya que siempre estará sobreexpresado cuando haya una infección viral oncogénica, sin embargo, no es lo suficientemente específica, ya que otros procesos oncogénicos no asociados al VPH, que aceleren el ciclo celular por esta misma vía de la pRb, podrían ocasionar también la sobreexpresión de p16 (97,98).

Se ha visto que la verdadera sobreexpresión de p16, asociada a la infección oncogénica con VPH, se da cuando esta es fuerte, difusa (en más del 70% de las células tumorales) y homogénea, tanto en núcleo como en citoplasma (98). Lamentablemente, no existe un estándar específico para la interpretación de la positividad para p16, lo cual hace que se interpreten como positivos casos en los que la inmunomarcación es débil y heterogénea o incluso como cualquier marcación sin importar intensidad, presencia nuclear o porcentaje de células tumorales marcadas (97). Esta última definición, si bien aumenta la sensibilidad, disminuye aún más la especificidad y es cuando se obtienen casos heterogéneos que son p16 positivos, pero VPH negativos (99).

A pesar de que la expresión de p16 por IHQ se considera un marcador sustitutivo de una infección oncogénica por VPH y esta prueba está validada como un marcador pronóstico, sólo los métodos directos

específicos para la detección de ADN proveen evidencia definitiva de presencia del agente infeccioso etiológico. Cuando se usa de forma única la IHQ para p16 (sin prueba directa de detección de ADN viral), esta es altamente sensible (94-100% de sensibilidad) pero es poco específica (79-82% de especificidad), lo que sugiere que la sobreexpresión de p16 sin realizar una prueba adicional más específica, carezca de precisión para la infección oncogénica por VPH (97,98).

Estos patrones equívocos que a menudo causan confusión entre los patólogos, se pueden aclarar realizando pruebas específicas para detección de ADN o ARNm viral, lo cual aumentaría la especificidad en la detección del virus y la precisión a la hora de catalogar correctamente a un carcinoma como VPH positivo o negativo.

DetECCIÓN DE ANTÍGENOS POR IHQ

El uso de anticuerpos policlonales contra las proteínas de la cápside L1 y L2 en biopsias puede confirmar la presencia de VPH en el carcinoma, sin embargo, esta prueba es poco sensible y específica y ha sido reemplazada por completo por la hibridación in situ (100).

HIBRIDACIÓN IN SITU CROMOGENICA (CISH)

La técnica de hibridación in situ está basada en sondas etiquetadas que se hibridan (se desnaturalizan con enzimas y se someten a calor para su combinación con el ADN tumoral) para unirse a secuencias blanco de ADN en los núcleos de las células tumorales. Estas sondas pueden ser específicas para un tipo específico de ADN o para un coctel para detectar múltiples tipos de VPH de alto riesgo al mismo tiempo. Estas sondas están marcadas con un cromógeno, lo cual va a permitir su visualización cuando ocurre la hibridación (señales). Las señales son visualizadas directamente en las células tumorales, lo que provee un contexto histológico directo. Este ensayo es muy específico, pero es de una sensibilidad limitada comparado con otros métodos como la PCR, la RT-PCR y la IHQ para p16. Pueden ocurrir falsos negativos particularmente en casos en los que la carga viral sea baja. Además, la interpretación de las señales puede ser subjetiva, debido a que no hay señales cromogénicas limpias con tinciones claras. Se ha demostrado que hasta un 10% de los casos tienen discordancias interobservadores. La mayoría de los casos son claramente positivos o negativos, pero los patólogos deben evaluar las señales focales o heterogéneas y decidir si son resultados reales o si se tratan de casos falsos positivos (101).

Existe una técnica relativamente más nueva, la hibridación in situ para ARN, la cual es altamente sensible y específica porque identifica la presencia de VPH transcripcionalmente activo. Se han desarrollado

pruebas como la *RNAscope*, que detecta ARNm de E6/E7 de 18 serotipos de VPH de alto riesgo. Muchos estudios han demostrado que la hibridación in situ para ARN tiene un desempeño excelente, comparable con el de la qRT-PCR en la estratificación de la supervivencia de los pacientes (101).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Otra prueba que se usa ampliamente en la detección del ADN del VPH es la PCR convencional. Esta consiste en una serie de pasos que se ejecutan en el siguiente orden: primero se realiza la extracción de ADN de la muestra tumoral, luego se utilizan moléculas de fragmentos de ADN (iniciadores o cebadores; *primers* en inglés) que se unen a secuencias específicas del ADN viral, proceso conocido como alineamiento, unión del cebador o *annealing* en inglés. Posteriormente se utiliza una enzima ADN polimerasa (Taq polimerasa) que sintetiza la cadena complementaria al ADN molde (el ADN viral en este caso) utilizando al *primer* como soporte inicial. Este último proceso se lleva a cabo en un termociclador, el cual mantiene la temperatura ideal para que funcione la polimerasa. La síntesis de ADN se lleva a cabo en ciclos y con cada ciclo se amplifica (se sintetiza de manera exponencial) el ADN viral, obteniéndose una cantidad mucho mayor de ADN al final de este proceso. Esto permite ser detectado posteriormente utilizando distintos métodos de secuenciación de ADN, que finalmente determinarán la secuencia de ADN y darán un diagnóstico de presencia o ausencia de ADN viral en la muestra tumoral.

Los *primers* más comunmente utilizados para amplificar secuencias específicas de ADN del VPH son: PGMY09, GP5+/GP6+ y SPF10 LiPA. Todos ellos tienen como blanco secuencias de ADN viral de longitudes variables del gen L1 del VPH (102). Todos estos grupos de *primers* están diseñados para unirse a una región constante en múltiples serotipos de VPH, por lo que se pueden identificar una gran cantidad de serotipos simultáneamente.

Los distintos métodos de PCR son sumamente sensibles en la detección de VPH de alto riesgo, pero los distintos ensayos varían en su desempeño basado en la elección de los grupos de *primers* a utilizar, los protocolos de PCR y el tipo de tejido analizado (tejido fresco congelado vs tejido fijado en formalina e incluido en parafina) (102).

Una limitación de los ensayos PCR es la posibilidad de obtener falsos positivos debido a contaminación con especímenes negativos de muestras amplificadas previamente en el laboratorio o de tejido no neoplásico circundante al tumor que está infectado por VPH. Otro problema es que no hay un tejido que dé el contexto para el resultado, por ejemplo, la positividad no se puede identificar directamente en las células tumorales en el tejido utilizado. Sin embargo, la limitación más importante es que los ensayos PCR

no pueden distinguir infecciones por VPH clínicamente significativas, es decir, infecciones por VPH que resulten en actividad transcripcional en las células tumorales con expresión de los genes E6 y E7, de las no significativas (103). La actividad transcripcional es la diferencia principal entre una infección tumoral clínicamente significativa y una clínicamente no significativa. Esto es más relevante en el CEOF, en donde hay suficiente evidencia que muestra que estos son los únicos tumores en los que poseer VPH de alto riesgo transcripcionalmente activo implica un pronóstico significativamente mejor (104).

Ensayos de fase líquida

Estos ensayos fueron diseñados para tamizaje de especímenes de citopatología del cuello uterino y representan una opción viable, en particular para la evaluación de metástasis a ganglios linfáticos cervicales de un tumor primario orofaríngeo oculto. Existen varios kits comerciales disponibles y aprobados por la FDA para detección de VPH de alto riesgo en citología de cuello uterino, como por ejemplo Hybrid Capture II (HC-2) de Qiagen, Cervista HPV HR assay y Cervista HPV 16/18 assay de Hologic Inc., Roche Cobas HPV test de Roche Molecular Systems y APTIMA HPV assay de Gen-Probe Inc. Sin embargo, estas pruebas también tienen problemas técnicos y de interpretación. Por ejemplo, el principal problema con el análisis de HC-2 es la falta de un control interno para verificar la presencia de ADN tumoral adecuado en la muestra, lo que puede llevar a falsos negativos (105). Adicionalmente, la prueba de Roche Cobas tiene menor especificidad cuando se compara con el CISH y la IHQ para p16 (106).

Los investigadores están estudiando estas pruebas para su uso en especímenes de CEOF y para metástasis ganglionares cervicales (105,106), sin embargo, estas pruebas casi no se utilizan en la práctica clínica rutinaria de los carcinomas de cabeza y cuello y ninguna de ellas está aprobada por la FDA para este propósito. Como gran cantidad de pacientes con CEOF se diagnostican inicialmente con citologías de metástasis ganglionares cervicales, estos podrían ser los únicos especímenes disponibles para establecer un diagnóstico. Por lo que establecer un diagnóstico preciso y fidedigno para la detección de VPH en material citológico es crítico y se debe seguir estudiando (107).

Detección de ARNm para E6/E7 mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa por transcriptasa reversa (qRT-PCR)

Esta técnica combina la transcripción reversa del ARNm viral en ADN y la posterior amplificación de secuencias blanco específicas (genes que codifican para E6 y E7) de ADN mediante PCR, llamándose PCR por transcriptasa reversa (RT-PCR). Se utiliza principalmente para medir una cantidad específica de ARN. Esto se consigue monitorizando la reacción de amplificación de ADN mediante fluorescencia, a lo que se

le conoce como PCR en tiempo real o PCR cuantitativa (qPCR). La combinación de qPCR con RT-PCR se le conoce como qRT-PCR y se utiliza de rutina en el análisis de la expresión genética y la cuantificación de ARN viral, tanto en el ambiente de investigación como en el clínico.

Este tipo de pruebas por lo general únicamente son aceptados cuando se realizan de manera adecuada en tejidos frescos congelados bien preservados, debido a la labilidad del ARNm en general. Sin embargo, dos grupos han utilizado satisfactoriamente la qRT-PCR para la amplificación de E6/E7 del VPH 16 en muestras de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (108,109).

La persistencia de la expresión oncogénica viral de E6/E7 del VPH de alto riesgo es esencial para la iniciación y mantenimiento de un fenotipo maligno dirigido por el VPH. La detección de fragmentos transcritos de ARNm de E6 y E7 de VPH de alto riesgo en CEOF correlaciona con daño al genoma celular y cambios genómicos que dirigen los sellos distintivos del cáncer. Por consiguiente, el estándar de oro teórico para la infección oncogénica por VPH es la demostración del VPH de alto riesgo transcripcionalmente activo en tejido fresco, usualmente utilizando la qRT-PCR, amplificando estos fragmentos transcritos (110,111).

A pesar de que esta prueba no se a utilizado ampliamente para evaluar el CEOF, puede ser justificado su uso como estándar de oro o de referencia, ya que las muestras tumorales frescas contienen moléculas intactas de ARNm que pueden ser amplificadas con alta fidelidad, en un ambiente controlado, permitiendo un análisis cuantitativo preciso de cantidad de material transcrito. Sin embargo, la qRT-PCR para transcritos de E6/E7 de VPH de alto riesgo es alcanzable en laboratorios de investigación, su utilidad clínica es muy limitada, principalmente por la preservación subóptima de las muestras biopsiadas que contienen moléculas de ARN muy degradadas para que esta prueba sea fidedigna. Por lo tanto, en la práctica clínica, las pruebas para la detección de VPH deben ser efectivas en fragmentos de tejido/células sueltas obtenidos de la BAAF y preservados en alcohol y de muestras de tejido fijado en formalina e incluido en parafina (99).

Utilidad de las pruebas

Para que una prueba sea aprobada para su uso rutinario en la práctica clínica, el hecho de aplicarla debe reflejar cambios en parámetros clínicos como la supervivencia general y la supervivencia libre de enfermedad. La evidencia más fuerte hasta la fecha de cualquier prueba como marcador pronóstico independiente la tiene la expresión de inmunohistoquímica para p16 (112,113), ya que está demostró que el pronóstico de personas con CEOF p16 positivo tuvieron una supervivencia general y libre de

enfermedad a 3 años muy similar a los casos positivos para ADN de VPH obtenido por PCR. Esta evidencia implica que las pruebas más específicas para la detección de VPH como la PCR, son redundantes para efectos pronósticos y por esta razón innecesarias en la práctica clínica. Además, la inmunohistoquímica para p16 se beneficia de su fácil interpretación y de una concordancia interobservador muy alta (114).

A pesar de esta evidencia y de que muchos oncólogos de cabeza y cuello están seguros de que la inmunohistoquímica para p16 es suficiente para la correcta clasificación del CEOF, otros expertos en esta área no están tan convencidos y sugieren que, si se realiza únicamente la prueba de inmunohistoquímica para p16, se produce un grupo heterogéneo de pacientes, que son los p16 positivos y ADN para VPH negativos. Hay evidencia que sugiere que estos pacientes con esta discordancia tienen un pronóstico pobre, similar a los casos de CEOF VPH negativo (108). Además, también se ha encontrado grupos de pacientes p16 negativos/ADN para VPH positivos, los cuales muestran mejor supervivencia cuando se añade quimioterapia (cisplatino o carboplatino con o sin 5-fluorouracilo) a su régimen terapéutico usual con radioterapia; sin embargo, tienen peor pronóstico que los p16 positivos/ADN para VPH positivos (115). Por estas razones, es que muchos no consideran al p16 como una prueba lo suficientemente específica y sugieren que la combinación de inmunohistoquímica para p16 con PCR cuantitativa (qPCR) para detección de ADN de VPH es el mejor discriminante para un pronóstico favorable. Esta prueba dual se volverá más importante conforme surjan más terapias dirigidas contra el CEOF VPH positivo (99).

Pruebas para detección de VPH en metástasis a ganglios linfáticos cervicales de un CEOF oculto

Este escenario es muy familiar en la práctica clínica y con frecuencia, el abordaje inicial es una biopsia por aspiración con aguja fina. En este contexto, la detección de VPH de alto riesgo en el aspirado puede dirigir de forma rápida y no invasiva a la búsqueda del tumor primario en la orofaringe (116). La utilidad del p16 como prueba única en este escenario es limitada, ya que esta proteína es ocasionalmente expresada en carcinomas de cabeza y cuello no relacionados con VPH que se originan en otros sitios anatómicos distintos a la orofaringe (49). Además, con frecuencia existe un dilema diagnóstico en el BAAF de masas quísticas cervicales de si se trata de un carcinoma escamoso metastásico o un quiste branquial. Para esto es importante que se defina adecuadamente el umbral para catalogar al p16 como positivo, ya que la evidencia indica que la expresión fuerte y difusa de este inmunomarcador, tanto nuclear como citoplasmática concuerda con una metástasis de primario orofaríngeo asociado a VPH, al contrario de otros carcinomas de cabeza y cuello no asociados a VPH como los surgidos en quistes branquiales, los cuales podrían tener una expresión de p16, pero más débil y heterogénea (117,118). El no tener claro estas diferencias en la expresión de p16 o el no ser lo suficientemente cuidadoso al interpretarlas puede

hacer que se catalogue a un carcinoma no asociado a VPH como carcinoma VPH positivo. Esto podría resolverse con pruebas específicas para la detección del VPH, como la PCR.

Rentabilidad de las pruebas para VPH

La introducción de la detección de rutina de VPH mediante PCR en los laboratorios de patología como parte de los programas de tamizaje para cáncer de cérvix probablemente baje los costos de estas pruebas debido a la realización de las pruebas a gran escala. Igualmente, los costos tanto de la inmunohistoquímica para p16 y de métodos más específicos para la detección de ADN son solo una pequeña fracción de los costos de todo el régimen oncológico.

Al día de hoy no hay evidencia para medir la rentabilidad de usar ambas pruebas para CEOF, pero la experiencia de otros cánceres más comunes sugiere que un biomarcador que indique mejor respuesta al tratamiento es costo efectivo y evita terapias innecesarias, como es el caso de la prueba de KRAS para cáncer colorrectal (99).

PREVENCIÓN DEL CARCINOMA ESCAMOSO DE CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE VPH POSITIVO

Prevención primaria

La prevención primaria del CEOF asociado a VPH implica evitar que este cáncer ocurra, previniendo los factores de riesgo que lo causan, en este caso sería la infección con el VPH de alto riesgo. Es decir, que la prevención primaria del CEOF VPH positivo implica evitar la infección con este virus. Esto se puede facilitar con las siguientes prácticas discutidas a continuación.

Factores conductuales:

El sexo oral con múltiples parejas sexuales es el factor de riesgo principal para adquirir una infección por VPH de alto riesgo (8,29). Por lo tanto, es lógico pensar que un estilo de vida monógamo, con una única pareja sexual de confianza a la hora de practicar relaciones sexuales, en especial sexo oral o contacto oral-anal, es un método efectivo para disminuir el contagio con este virus. Otro método efectivo sería la no práctica de sexo oral como es costumbre en algunos lugares del mundo, esto por motivos culturales o religiosos que lo prohíben. En estos países, la incidencia de CEOF VPH positivo se ha mantenido estable a lo largo de los años, a diferencia de países desarrollados.

Sin embargo, los hábitos sexuales de la sociedad cambian y han cambiado en las nuevas generaciones, siendo el sexo oral una práctica común, en especial entre las personas más jóvenes. Esto, además de mayor prevalencia de múltiples parejas sexuales con respecto a generaciones previas hace que el riesgo de adquirir la infección sea alto y que exigir abstinencia de esta práctica a una sociedad que la considera normal puede no ser del todo un método efectivo, por lo que otros métodos podrían ayudar a disminuir el riesgo de contagio en caso de que se practique el sexo oral.

Métodos de barrera:

Estos métodos implican utilizar elementos mecánicos directamente entre las dos superficies que van a estar en contacto sexual, en el caso del sexo oral estas dos superficies son la boca de uno de los participantes y los genitales o región anal del otro. Se pueden utilizar distintas alternativas como los protectores dentales (*dental dam*) de látex o nitrilo, los cuales consisten en láminas cuadradas de 15 cm de lado, usados en las cirugías odontológicas para aislar el campo quirúrgico del resto de la boca. Estos se colocan entre la boca y los genitales a la hora de la práctica del sexo oral para disminuir el riesgo de contagio (119).

Una alternativa si no se logran conseguir estos elementos es cortarles los extremos a un preservativo y luego cortarlo de forma longitudinal, esto le dará una forma cuadrada que podrá ser utilizada de la misma manera que el protector dental (119).

Vacuna:

Vacunas profilácticas actuales contra la infección por el VPH:

Actualmente, hay tres vacunas profilácticas contra VPH aprobadas por la FDA; estas son Gardasil (tetavalente) que protege contra los serotipos 6, 11, 16 y 18 del VPH, Cervarix (bivalente) que protege contra los serotipos 16 y 18 del VPH y Gardasil-9 (nonavalente) que protege contra los serotipos 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 y 58 del VPH. Todas estas vacunas están aprobadas para ser aplicadas en mujeres de 9 a 25 años (Cervarix) o 9-26 años (Ambas versiones de Gardasil). En hombres de 9-26 años está aprobada la Gardasil tetavalente y en hombres de 9 a 15 años está aprobada la Gardasil-9 nonavalente. La Cervarix no ha sido aprobada para su aplicación en hombres (120).

En el año 2006, Gardasil de la compañía Merck fue la primera vacuna profiláctica en ser aprobada para prevención del cáncer de cuello uterino y verrugas genitales. Posteriormente, la aprobación se extendió para hombres para prevenir verrugas genitales en 2009 y carcinoma del canal anal en 2010. La vacuna

Cervarix de la compañía GlaxoSmithKline se aprobó en 2009 para mujeres. En el año 2014, se aprobó la vacuna Gardasil-9 tanto para hombres como para mujeres. Las tres vacunas tienen un esquema de tres dosis que se aplican a lo largo de 6 meses (120).

Todas las vacunas disponibles utilizan partículas similares a virus de la proteína L1 del VPH. A pesar de que Cervarix sólo está diseñada para proteger contra los serotipos 16 y 18 del VPH, hay evidencia de que hay reacción cruzada con otros serotipos de alto riesgo (121).

La eficacia biológica de estas vacunas en la prevención de infección del cuello uterino por el VPH fue establecida a través de ensayos clínicos a gran escala realizados en mujeres de 15 a 26 años que evaluaron Gardasil y Cervarix (122,123). Uno de los ensayos clínicos que evaluó Cervarix fue desarrollado en Costa Rica (124).

Se estudió también la vacuna en otras poblaciones como hombres, mujeres mayores y niños. Estos estudios demostraron efectividad de la vacuna cuadrivalente para prevención de lesiones genitales externas en hombres (neoplasia intraepitelial o carcinoma de pene, anal, perianal o perineal). También, demostraron disminución de infecciones persistentes en mujeres entre 24 y 45 años, así como elevación de títulos de anticuerpos contra el virus en mujeres de 45 a 55 años. En niños, los estudios permitieron detectar títulos de anticuerpos altos que permanecieron estables por hasta 8 años, lo cual permitiría la reducción de la infección oral por VPH cuando en un futuro estas poblaciones estén en contacto con el virus (120).

Actualmente, hay pocos estudios que evalúen el impacto de la vacunación contra VPH en la infección oral u orofaríngea con este virus. Esto es debido a que la asociación entre el VPH y el cáncer orofaríngeo se estableció hace relativamente poco y al hecho de que el tamaño de las muestras y las implicaciones del costo de los ensayos clínicos no fueron diseñados para el estudio de la infección oral con el VPH en el contexto de las vacunas (120).

Hay datos recolectados del estudio de cohorte de vacunación realizado en Costa Rica que provee evidencia indirecta de la eficacia potencial de la vacuna en prevenir la infección oral por el virus (125). La eficacia de la inmunidad pasiva muestra la importancia de los anticuerpos de IgG e IgA en proveer protección contra la infección de la mucosa oral. Se ha propuesto que estos anticuerpos están más elevados en la mucosa oral de poblaciones vacunadas, ya que se ha demostrado que lo están en mujeres con historia de NIC. Sin embargo, aún no hay datos suficientes que evalúen directamente la respuesta de los anticuerpos de la mucosa oral a la vacunación y su correlación con la efectividad de la vacuna (120).

Otros estudios han usado modelos predictivos para entender el beneficio potencial de la vacunación en el contexto de CEOF. Uno de estos modelos mostró que incluso con un 50% de absorción de la vacuna y un 50% de efectividad de la vacuna, vacunar a hombres jóvenes específicamente para la prevención de cáncer orofaríngeo podría ser costo efectivo (126). Debido a la edad promedio de diagnóstico del CEOF, la cual es mayor a la del cáncer de cérvix (58 vs 48 años), la reducción en la incidencia y mortalidad del CEOF VPH positivo a causa de la vacuna no serían observados sino hasta el año 2060 (3).

También, existen otras preguntas y dudas que aún no han sido resueltas en lo que respecta a la prevención del CEOF por medio de la vacuna. Entre ellas si se requiere la misma dosis o una mayor para proveer protección contra la infección orofaríngea con el VPH, si la vacuna sería efectiva en hombres mayores con un sistema inmune más deficiente (causa de un segundo pico de incidencia de esta infección en hombres entre 55 y 60 años), si se requeriría un refuerzo a esta edad debido a esta misma razón, entre otras (120).

Prevención secundaria

La prevención secundaria del CEOF asociado a VPH implica reducir o atenuar el impacto o daño que este cáncer pueda causar cuando este ya ha ocurrido debido a una falla en la prevención primaria. Es decir, son métodos de prevención que buscan detectar este cáncer a etapas más tempranas, para así disminuir la morbilidad y mortalidad que este pueda tener en los pacientes afectados (127).

Ninguno de estos métodos ha demostrado ser efectivo en detectar el cáncer a etapas tempranas, debido a que no se ha demostrado la presencia de lesiones precursoras al CEOF, a lo ocultas que pueden estar los tumores primarios (ubicación profunda dentro de las criptas amigdalinas y pequeño tamaño), a la facilidad de estos tumores de hacer metástasis a ganglios linfáticos regionales aún con un tamaño pequeño o completamente ocultos y a la baja especificidad de los anticuerpos en suero y otros biomarcadores en demostrar una infección por VPH de alto riesgo transcripcionalmente activa. A continuación, se analizarán las principales pruebas que se han propuesto para utilizar como auxiliares en prevención secundaria del CEOF VPH positivo (127).

Serologías y otros biomarcadores:

Consiste en detectar anticuerpos contra las proteínas de la cápside del VPH L1 y L2 o contra oncoproteínas tempranas como E6. Estos títulos de anticuerpos se elevan al haber habido infección con el VPH. Estas pruebas pueden ser lo suficientemente específicas para detectar anticuerpos contra VPH de alto riesgo, pero no lo suficientemente específicas para detectar una infección persistente transcripcionalmente

activa (oncogénica), las cuales son la minoría de los casos de infección por VPH, ya que en la mayoría de los casos la infección es eliminada por el sistema inmunológico. Esto hace que la prueba sea poco efectiva para detectar los casos de cáncer temprano ya que no filtra a la mayoría de los pacientes que se liberan de la infección (128,129).

Detección de ADN para VPH en cavidad oral:

Se ha propuesto la detección de VPH en células de la cavidad oral mediante cepillados o hisopados de esta mucosa y la realización de pruebas que detecten ADN viral para VPH sea por PCR convencional o por métodos de fase líquida. Estas pruebas presentan el mismo problema de la serología que no detectan ARNm para E6/E7 (infección transcripcionalmente activa) y por lo tanto tienen una baja especificidad para detectar los pacientes que tengan mayor riesgo de portar un CEOF. Además, son métodos relativamente costosos para aplicar como tamizaje a nivel de la población masculina general. En caso de la realización de qRT-PCR en estas muestras, el costo y lo delicado que es el proceso para mantener preservado el ARNm hacen de esta prueba un método poco viable en la práctica clínica (99,103,104,130).

US de cuello:

Se ha propuesto realizar ultrasonido de cuello a los hombres en edad de riesgo para este cáncer. Esto basándose en el hecho de que el hallazgo más frecuente al momento de presentación es la presencia de metástasis cervicales. La idea es detectar estas metástasis tempranamente y así disminuir la mortalidad por este cáncer. Sin embargo, los estudios no han demostrado disminuir la mortalidad, ni tampoco son prácticos para aplicar a toda la población masculina como método de tamizaje, ya que la gran mayoría de pacientes infectados no desarrollará CEOF VPH positivo. Se requeriría de un tamizaje previo adicional que filtre a estos pacientes que lograron eliminar la enfermedad para así realizar el ultrasonido a los que tienen mayor riesgo de portar el cáncer. Esto con el fin de que sea útil en el contexto clínico (131).

Citología de mucosa orofaríngea:

La citología de la mucosa orofaríngea vendría a ser un complemento de la detección de ADN viral en las células de cepillados o hisopados orofaríngeos, como se hace en las citologías de cuello uterino con mucha efectividad. Sin embargo, en cavidad oral existe el problema de que, a diferencia del cuello uterino, no existen lesiones precancerosas detectables e incluso el tumor puede ser tan pequeño y profundo que aún presente, no se logren recolectar células tumorales para la valoración citológica al microscopio. Volviéndose un método inefectivo para el tamizaje en el contexto clínico (132).

FUTUROS ESTUDIOS REQUERIDOS A NIVEL MUNDIAL Y A NIVEL NACIONAL

A nivel mundial, se requiere principalmente de ensayos clínicos que demuestren la efectividad directa de la vacuna en la prevención del CEOF para así tener la aprobación de la vacuna por instituciones importantes como la FDA y la OMS, esto para su aplicación en niños varones (de edades similares a las niñas a las que se les aplica la vacuna para prevención del cáncer de cérvix) con el fin específico de reducir la infección orofaríngea con el VPH de alto riesgo y así tener un impacto en la incidencia del CEOF VPH positivo. Como fue mencionado previamente, a pesar de que se aplique masivamente esta vacuna en niños, la edad promedio de presentación más alta del CEOF VPH positivo hará que el impacto hacia la baja en la incidencia de este cáncer no se note hasta el año 2060. Otros estudios requeridos son los que indiquen la necesidad o no de un refuerzo de la vacuna a edades en donde se presenta el segundo pico de incidencia de infección por VPH oncogénico (55 a 60 años) o si la vacuna es del todo efectiva si se aplica por primera vez a esta edad. También, se debe estudiar la sensibilidad y especificidad de combinaciones de pruebas de detección directa del VPH junto con la IHQ para p16, para así obtener un método diagnóstico para clasificar de manera precisa al CEOF como VPH positivo o VPH negativo, en especial métodos prometedores más recientes como la hibridación in situ para ARN. Se debe seguir investigando además con los métodos de prevención secundaria del CEOF VPH positivo, para lograr identificar algún algoritmo que permita tamizar adecuadamente a los pacientes, detecte este cáncer más tempranamente y disminuya su mortalidad aún más.

En Costa Rica, se requiere de estudios epidemiológicos que logren categorizar la incidencia real del CEOF VPH positivo en comparación con el VPH negativo, para así obtener una base de datos congruente a nuestra población y además que sea reciente. Esto con el fin de comparar las tendencias en incidencia con las descritas a nivel mundial y a nivel de los países desarrollados de Europa Occidental y Nórdica y de los EEUU. Una base de datos nacional es importante para así crear un plan de diagnóstico y tratamiento adecuado a nuestra población, crear conciencia entre los trabajadores de las ciencias de la salud y por consiguiente en la población general sobre la existencia de este cáncer, sus factores de riesgo y su comportamiento tan particular con respecto al CEOF VPH negativo. Además de estos estudios, se puede aportar a la investigación mundial con estudios que utilicen pruebas como el CISH y la PCR como métodos auxiliares a la IHQ para aumentar la especificidad del diagnóstico de infección transcripcionalmente activa por VPH de alto riesgo, ya que son recursos disponibles en algunos hospitales centrales y en instituciones de investigación nacionales. Incluso se podrían desarrollar nuevos ensayos clínicos con las vacunas existentes, incluso la nonavalente, para estudiar su efectividad en la prevención

del CEOF VPH positivo, solamente que esto requeriría de mucha organización y recursos, además de protocolos complejos que se apeguen a la bioética y a las leyes nacionales de la bioética, lo cual es un área con la que se cuenta con poca experiencia en el país.

CONCLUSIONES

1. El CEOF VPH positivo es una entidad que ha aumentado significativamente en incidencia, en especial en la población masculina (4 a 5 veces más en hombres que en mujeres) en las últimas décadas. Esto ha llamado la atención de investigadores que han estudiado esta neoplasia tanto a nivel clínico como molecular. Este cáncer, al ser asociado al VPH, tiene como factor de riesgo todos los comportamientos que aumenten el riesgo de contagio de la mucosa oral con el virus. El aumento en la incidencia obedece posiblemente a una práctica más frecuente del sexo oral entre generaciones más jóvenes.
2. El CEOF VPH positivo suele presentarse como una masa quística en cuello, que demuestra el alto potencial metastásico temprano de este cáncer. Estas metástasis quísticas suelen asociarse a un tumor orofaríngeo relativamente pequeño y en muchos casos oculto o indetectable clínicamente.
3. Los estudios han demostrado que este cáncer tiene sus características histopatológicas particulares y que, a pesar de su potencial metastásico temprano, se comporta de manera menos agresiva que el CEOF VPH negativo y tiene una supervivencia considerablemente mejor, lo cual lleva a destacar la importancia de la precisa clasificación como VPH positivo o negativo, utilizando pruebas lo suficientemente sensibles y específicas, así como rentables para el sistema de salud que las realiza.
4. El sistema de estadificación de la 8ª edición de la AJCC cambió en el año 2018, con el fin de estadificar de manera distinta el CEOF VPH positivo y VPH negativo, esto debido a las importantes diferencias en el pronóstico entre ambas neoplasias. También, se estableció la importancia de realizar la prueba p16 para todos los CEOF con el fin de aplicar de manera adecuada esta estadificación nueva.
5. Se requieren estudios adicionales que logren demostrar contundentemente la importancia de la utilización de métodos directos para la detección de ADN o ARNm viral en conjunto con la inmunohistoquímica para p16, con el fin de aumentar la sensibilidad y especificidad a la hora de detectar el VPH en muestras de CEOF y evitar grupos heterogéneos como los p16 positivos/VPH negativos. También se debe establecer y estandarizar qué significa positividad para p16 y definirla con base en los estudios que

demuestren mayor correlación con los métodos directos para detección de VPH, lo cual impresiona implicar positividad fuerte y difusa en núcleo y citoplasma en más del 70% de las células tumorales.

6. La BAAF y la citología son medios útiles en el diagnóstico de estas lesiones debido a su usual presentación clínica con enfermedad metastásica a ganglios cervicales con un tumor primario pequeño u oculto. En este contexto, también son importantes las pruebas de detección directa del virus para el diagnóstico temprano de esta enfermedad y la búsqueda del tumor primario en orofaringe.
7. La vacuna ha demostrado ser efectiva para la prevención del desarrollo de lesiones intraepiteliales y carcinoma de cuello uterino en mujeres y de lesiones intraepiteliales de pene, ano y región perianal en hombres. Aún se requiere de evidencia de mayor fortaleza que demuestre que la vacuna también funciona para prevenir el desarrollo de carcinoma escamoso de cavidad oral y orofaringe, en especial en la población masculina que es a la que más afecta.
8. Los métodos de prevención secundaria no han demostrado ser efectivos para reducir la mortalidad por el CEOF VPH positivo, esto principalmente debido a la ausencia de lesiones precancerosas en orofaringe para este cáncer y debido a la pobre especificidad de los métodos que se han propuesto.
9. Se debe enfatizar la importancia de los estudios epidemiológicos y ensayos clínicos tanto a nivel mundial como a nivel nacional para así obtener evidencia de mejores métodos diagnósticos, efectividad de la vacuna para prevenir este cáncer y tener una base de datos nacional del comportamiento de estas neoplasias.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aupérin A. Epidemiology of head and neck cancers: an update. *Curr Opin Oncol*. 2020;32(3):178–86.
2. Vigneswaran N, Williams MD. Epidemiological Trends in Head and Neck Cancer and Aids in Diagnosis. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2014;26(2):123–41.
3. 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.
4. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Paula Curado M, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *J Clin Oncol*. 2013;31(36):4550–9.
5. Keeping ST, Tempest MJ, Stephens SJ, Carroll SM, Simcock R, Jones TM, et al. The cost of oropharyngeal cancer in England: A retrospective hospital data analysis. *Clin Otolaryngol*. 2018;43(1):223–9.
6. O’Sullivan B, Lydiatt WM, Haughey BH, Brandwein-Gensler M, Glastonbury CM, Shah JP. *AJCC Cancer Staging Manual*. 8th ed. Amin MB, Meyer LR, Gress DM, editors. Springer International Publishing; 2017. 113–121 p.
7. International Agency for Research on Cancer. PRIMARY END-POINTS FOR PROPHYLACTIC HPV VACCINE TRIALS: Chapter 8 [Internet]. Vol. 7, IARC Working Group Reports Volume 7. 2013. 86–92 p. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304971/pdf/Bookshelf_NBK304971.pdf
8. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJF, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S, et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: Head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine* [Internet]. 2012;30(SUPPL.5):F34–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.05.070>
9. Mills SE. *Histology for Pathologists* [Internet]. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2014.

- 461–474 p. Available from: <http://journals.lww.com/00000478-201404000-00020>
10. Thanc Guide. Oropharyngeal cancer [Internet]. 2020. Available from: <https://thancguide.org/cancer-types/throat/pharyngeal/oropharyngeal/>
 11. Thanc Guide. Oropharyngeal Anatomy [Internet]. 2020. Available from: <https://thancguide.org/cancer-types/throat/pharyngeal/oropharyngeal/anatomy/>
 12. Gnepp DR, Bishop JA. Gnepp's Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck. 3rd ed. Elsevier Inc.; 2020.
 13. Kato MG, Baek C-H, Chaturvedi P, Gallagher R, Kowalski LP, Leemans CR, et al. Update on oral and oropharyngeal cancer staging – International perspectives. *World J Otorhinolaryngol - Head Neck Surg.* 2020;6(1):66–75.
 14. Deng F. Radiopaedia: Lymph node levels of the neck [Internet]. 2020. Available from: <https://radiopaedia.org/articles/lymph-node-levels-of-the-neck>
 15. Begum S. Tissue Distribution of Human Papillomavirus 16 DNA Integration in Patients with Tonsillar Carcinoma. *Clin Cancer Res [Internet].* 2005 Aug 15;11(16):5694–9. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-05-0587>
 16. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. Global Cancer Observatory [Internet]. 2018 [cited 2020 Sep 21]. Available from: https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-table?v=2018&mode=cancer&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=asr&sex=0&cancer=39&type=1&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&group_cancer=1&i
 17. Ministerio de Salud de Costa Rica. Estadística del Cáncer - Registro Nacional de Tumores [Internet]. [cited 2020 Sep 20]. Available from: <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/vigilancia-de-la-salud/estadisticas-y-bases-de-datos/estadisticas/estadistica-de-cancer-registro-nacional-tumores>

18. Jemal A, Simard EP, Dorell C, Noone AM, Markowitz LE, Kohler B, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2009, featuring the burden and trends in human papillomavirus (HPV)-associated cancers and HPV vaccination coverage levels. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(3):175–201.
19. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol.* 2011;29(32):4294–301.
20. Forte T, Niu J, Lockwood GA, Bryant HE. Incidence trends in head and neck cancers and human papillomavirus (HPV)-associated oropharyngeal cancer in Canada, 1992-2009. *Cancer Causes Control.* 2012;23(8):1343–8.
21. Reddy VM, Cundall-Curry D, Bridger MWM. Trends in the incidence rates of tonsil and base of tongue cancer in England, 1985-2006. *Ann R Coll Surg Engl.* 2010;92(8):655–9.
22. Braakhuis BJM, Visser O, René Leemans C. Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults. *Oral Oncol [Internet].* 2009;45(9):e85–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.03.010>
23. Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: Focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer.* 2011;129(3):733–41.
24. Mork J, Møller B, Dahl T, Bray F. Time trends in pharyngeal cancer incidence in Norway 1981-2005: A subsite analysis based on a reabstraction and recoding of registered cases. *Cancer Causes Control.* 2010;21(9):1397–405.
25. Hwang TZ, Hsiao JR, Tsai CR, Chang JS. Incidence trends of human papillomavirus-related head and neck cancer in Taiwan, 1995-2009. *Int J Cancer.* 2015;137(2):395–408.
26. Hong A, Lee CS, Jones D, Veillard A-S, Zhang M, Zhang X, et al. Rising prevalence of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer in Australia over the last 2 decades.

- Wiley Online Libr. 2016;38(5):743–50.
27. Hong AM, Grulich AE, Jones D, Lee CS, Garland SM, Dobbins TA, et al. Squamous cell carcinoma of the oropharynx in Australian males induced by human papillomavirus vaccine targets. *Vaccine* [Internet]. 2010;28(19):3269–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.02.098>
 28. Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, Romanitan M, Onelöv L, Joneberg J, et al. Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer*. 2006;119(11):2620–3.
 29. Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, Winn DM, Smith EM, Shan'gina O, et al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: A pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol*. 2009;39(1):166–81.
 30. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2012;307(7):693–703.
 31. Fakhry C, Andersen KK, Christensen J, Agrawal N, Eisele DW. The impact of tonsillectomy upon the risk of oropharyngeal carcinoma diagnosis and prognosis in the Danish Cancer Registry. *Cancer Prev Res*. 2015;8(7):583–9.
 32. Chaturvedi AK. Tonsillectomy and risk of oropharyngeal cancer: Implications for research and prevention. *Cancer Prev Res*. 2015;8(7):577–9.
 33. Thompson LDR, Bishop JA. *Head and Neck Pathology E-Book*. 3rd ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc.; 2019.
 34. 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* [Internet]. 2015;51(4):341–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.01.002>
 35. Sannigrahi M, Singh V, Sharma R, Panda N, Radotra B, Khullar M. Detection of active

- human papilloma virus-16 in head and neck cancers of Asian North Indian patients. *Oral Dis.* 2016;22(1):62–8.
36. Morris LGT, Sikora AG, Patel SG, Hayes RB, Ganly I. Second primary cancers after an index head and neck cancer: Subsite-specific trends in the era of human papillomavirus - Associated oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol.* 2011;29(6):739–46.
 37. Collaborators. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature [Internet].* 2015 Jan 28;517(7536):576–82. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature14129>
 38. Lechner M, Frampton GM, Fenton T, Feber A, Palmer G, Jay A, et al. Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors. *Genome Med [Internet].* 2013;5(5):49. Available from: <http://genomemedicine.com/content/5/5/49>
 39. Gorenchtein M, Poh CF, Saini R, Garnis C. MicroRNAs in an oral cancer context-from basic biology to clinical utility. *J Dent Res.* 2012;91(5):440–6.
 40. Sartor MA, Dolinoy DC, Jones TR, Colacino JA, Prince MEP, Carey TE, et al. Genome-wide methylation and expression differences in HPV(+) and HPV(-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. *Epigenetics.* 2011;6(6):777–87.
 41. Lajer CB, Garnæs E, Friis-Hansen L, Norrild B, Therkildsen MH, Glud M, et al. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: Bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *Br J Cancer.* 2012;106(9):1526–34.
 42. Ducatman BS. The role of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2018;142(6):715–8.
 43. International Agency for Research on Cancer. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans VOLUME 90 Human Papillomaviruses [Internet]. Vol. 90, Iarc Monographs On The

Evaluation Of Carcinogenic Risks To Humans. 2007. 670 p. Available from:
<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Monographs+on+the+Evaluation+of+Carcinogenic+Risks+to+Humans+VOLUME+90+Human+Papillomaviruses#0>

44. Sudhoff HH, Schwarze HP, Winder D, Steinstraesser L, Görner M, Stanley M, et al. Evidence for a causal association for HPV in head and neck cancers. *Eur Arch Oto-Rhino-Laryngology*. 2011;268(11):1541–7.
45. Chaturvedi AK, Gillison ML. Human papillomavirus and head and neck cancer. In: Olshan A, editor. *Epidemiology, pathogenesis, and prevention of head and neck cancer*. [Internet]. Olshan AF, editor. New York, NY: Springer New York; 2010. 87–116 p. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4419-1472-9>
46. Carbone M, Pass HI. Multistep and multifactorial carcinogenesis: When does a contributing factor become a carcinogen? *Semin Cancer Biol*. 2004;14(6):399–405.
47. Niedobitek G, Pitteroff S, Herbst H, Shepherd P, Finn T, Anagnostopoulos I, et al. Detection of human papillomavirus type 16 DNA in carcinomas of the palatine tonsil. *J Clin Pathol*. 1990;43(11):918–21.
48. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):709–20.
49. Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005;11(16):5694–9.
50. Ferris RL, Martinez I, Sirianni N, Wang J, López-Albaitero A, Gollin SM, et al. Human papillomavirus-16 associated squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): A natural disease model provides insights into viral carcinogenesis. *Eur J Cancer*. 2005;41(5):807–15.

51. Steenbergen RDM, Walboomers JMM, Meijer CJLM, Snijders PJF, Hermsen MAJA, Joenje H, et al. Integrated Human Papillomavirus Type 16 and Loss of Heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an Oral Carcinoma and Its Derivative Cell Line. *Cancer Res.* 1995;55(22):5465–71.
52. Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A. E6 and E7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(6):412–23.
53. Strati K, Pitot HC, Lambert PF. Identification of biomarkers that distinguish human papillomavirus (HPV)-positive versus HPV-negative head and neck cancers in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(38):14152–7.
54. Smeets SJ, Van Der Plas M, Schaaïj-Visser TBM, Van Veen EAM, Van Meerloo J, Braakhuis BJM, et al. Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways. *Int J Cancer.* 2011;128(7):1596–605.
55. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356(19):1944–56.
56. Rajkumar T, Sridhar H, Balaram P, Vaccarella S, Gajalakshmi V, Nandakumar A, et al. Oral cancer in Southern India: The influence of body size, diet, infections and sexual practices. *Eur J Cancer Prev.* 2003;12(2):135–43.
57. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(23):1801–10.
58. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: The international agency for research on cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95(23):1772–83.
59. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, et al. Human papillomavirus

- infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2001;344(15):1125–31.
60. Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, Ghadirian P, Zeitouni AG, Viscidi RP, et al. Human papillomavirus infection and oral cancer: A case-control study in Montreal, Canada. *Oral Oncol*. 2008;44(3):242–50.
 61. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90(21):1626–36.
 62. Smith E.M., Ritchie J.M., Pawlita M., Rubenstein L.M., Haugen T.H., Turek L.P., et al. Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer [Internet]. Vol. 120, *International Journal of Cancer*. 2007. p. 825–32. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L46175403%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1002/ijc.22330>
 63. Tachezy R, Klozar J, Rubenstein L, Smith E, Saláková M, Šmahelová J, et al. Demographic and risk factors in patients with head and neck tumors. *J Med Virol* [Internet]. 2009 May;81(5):878–87. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmv.21470>
 64. Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, 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(2):489–502.
 65. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. 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(6):407–20.
 66. Furniss CS, McClean MD, Smith JF, Bryan J, Applebaum KM, Nelson HH, et al. Human papillomavirus 6 seropositivity is associated with risk of head and neck squamous cell carcinoma, independent of tobacco and alcohol use. *Ann Oncol*. 2009;20(3):534–41.
 67. Hansson BG, Rosenquist K, Antonsson A, Wennerberg J, Schildt EB, Bladström A, et al.

- Strong association between infection with human papillomavirus and oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 2005;125(12):1337–44.
68. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer Causes Control.* 2010;21(9):1369–78.
69. Ji X, Neumann AS, Sturgis EM, Adler-Storthz K, Dahlstrom KR, Schiller JT, et al. P53 Codon 72 Polymorphism Associated With Risk of Human Papillomavirus-Associated Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx in Never-Smokers. *Carcinogenesis.* 2008;29(4):875–9.
70. Arthur AE, Duffy SA, Sanchez GI, Gruber SB, Terrell JE, Hebert JR, et al. Higher micronutrient intake is associated with human papillomavirus- positive head and neck cancer: A case-only analysis. *Nutr Cancer.* 2011;63(5):734–42.
71. MAYNE ST, MORSE DE, WINN DM. Cancers of the Oral Cavity and Pharynx. In: *Cancer Epidemiology and Prevention* [Internet]. Oxford University Press; 2006. p. 674–96. Available from: <https://oxford.universitypressscholarship.com/view/10.1093/acprof:oso/9780195149616.001.0001/acprof-9780195149616-chapter-35>
72. Nagpal JK, Patnaik S, Das BR. Prevalence of high-risk human papilloma virus types and its association with p53 codon 72 polymorphism in tobacco addicted oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients of Eastern India. *Int J Cancer.* 2002;97(5):649–53.
73. Yu H, Sturgis EM, Liu Z, Wang LE, Wei Q, Li G. Modifying effect of MDM4 variants on risk of HPV16-associated squamous cell carcinoma of oropharynx. *Cancer.* 2012;118(6):1684–92.
74. Liang C, McClean MD, Marsit C, Christensen B, Peters E, Nelson HH, et al. A population-based case-control study of marijuana use and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Prev Res.* 2009;2(8):759–68.

75. Tezal M, Nasca MS, Stoler DL, Melendy T, Hyland A, Smaldino PJ, et al. Chronic periodontitis-human papillomavirus synergy in base of tongue cancers. *Arch Otolaryngol - Head Neck Surg.* 2009;135(4):391–6.
76. Lewis JS. Morphologic diversity in human papillomavirus-related oropharyngeal squamous cell carcinoma: Catch Me If You Can! *Mod Pathol.* 2017;30(s1):S44–53.
77. Shantz S, Harrison LB, Hong W. Cancer of the head and neck. In: DeVita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., Editor. *Principles and Practice of Oncology.* 4th ed. Philadelphia, PA: JB Lippincott; 1993. 574–672 p.
78. Parsons JT, Mendenhall WM, Stringer SP, Amdur RJ, Hinerman RW, Villaret DB, et al. Squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Cancer [Internet].* 2002 Jun 1;94(11):2967–80. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.10567>
79. Barnes L, Johnson JT. Pathologic and clinical considerations in the evaluation of major head and neck specimens resected for cancer. Part I. *Pathol Annu [Internet].* 1986;21 Pt 1(1):173–250. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3510415>
80. Bauml J, Seiwert TY, Pfister DG, Worden F, Liu S V., Gilbert J, et al. Pembrolizumab for Platinum- and Cetuximab-Refractory Head and Neck Cancer: Results From a Single-Arm, Phase II Study. *J Clin Oncol [Internet].* 2017 May 10;35(14):1542–9. Available from: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.70.1524>
81. Seiwert TY, Burtneß B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol [Internet].* 2016 Jul;17(7):956–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204516300663>
82. Sher DJ, Rusthoven CG, Khan SA, Fidler MJ, Zhu H, Koshy M. National patterns of care and predictors of neoadjuvant and concurrent chemotherapy use with definitive radiotherapy in the treatment of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer [Internet].* 2017 Jan 15;123(2):273–82. Available from:

<http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.30255>

83. Horne ZD, Glaser SM, Vargo JA, Ferris RL, Balasubramani GK, Clump DA, et al. Confirmation of proposed human papillomavirus risk-adapted staging according to AJCC/UICC TNM criteria for positive oropharyngeal carcinomas. *Cancer* [Internet]. 2016 Jul 1;122(13):2021–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncr.30021>
84. Suvarna K, Layton C, Bancroft J. No Title. 7th ed. Churchill Livingstone; 2013. 105–111; 381–390 p.
85. Muñoz N, Castellsagué X, de González AB, Gissmann L. Chapter 1: HPV in the etiology of human cancer. *Vaccine* [Internet]. 2006 Aug;24:S1–10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0264410X06005913>
86. Tumban E. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. *Viruses*. 2019;11(10).
87. de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* [Internet]. 2004 Jun;324(1):17–27. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S004268220400220X>
88. Conway MJ, Meyers C. Replication and Assembly of Human Papillomaviruses. *J Dent Res* [Internet]. 2009 Apr 30;88(4):307–17. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0022034509333446>
89. Kumar V, Abbas A, Fausto N, Aster J. Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease (Robbins Pathology). 10th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc.; 2020. 324–325 p.
90. Woods RS, O'Regan EM, Kennedy S, Martin C, O'Leary JJ, Timon C. Role of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma: A review. *World J Clin Cases*. 2014;2(6):172.
91. Doorbar J. Molecular biology of human papillomavirus infection and cervical cancer. *Clin Sci* [Internet]. 2006 May 1;110(5):525–41. Available from: <https://portlandpress.com/clinsci/article/110/5/525/68249/Molecular-biology-of->

human-papillomavirus

92. Wheeler CM. Natural History of Human Papillomavirus Infections, Cytologic and Histologic Abnormalities, and Cancer. *Obstet Gynecol Clin North Am* [Internet]. 2008 Dec;35(4):519–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0889854508000740>
93. Lace MJ, Anson JR, Klussmann JP, Wang DH, Smith EM, Haugen TH, et al. Human Papillomavirus Type 16 (HPV-16) Genomes Integrated in Head and Neck Cancers and in HPV-16-Immortalized Human Keratinocyte Clones Express Chimeric Virus-Cell mRNAs Similar to Those Found in Cervical Cancers. *J Virol* [Internet]. 2011 Feb 15;85(4):1645–54. Available from: <https://jvi.asm.org/content/85/4/1645>
94. Rampias T, Sasaki C, Psyrris A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncol* [Internet]. 2014 May;50(5):356–63. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837513006428>
95. Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R. Structure of the Human Papillomavirus E7 Oncoprotein and Its Mechanism for Inactivation of the Retinoblastoma Tumor Suppressor. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Jan 6;281(1):578–86. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M508455200>
96. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol* [Internet]. 2010 Aug;11(8):781–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204510700176>
97. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJM, Haesevoets A, Snijders PJF, 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(11):2465–72.
98. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Jones TM, Sheard J, et al. Evaluation of Human Papilloma Virus Diagnostic Testing in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: Sensitivity, Specificity, and Prognostic Discrimination. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2011 Oct 1;17(19):6262–71. Available from:

<http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-11-0388>

99. Robinson M, Schache A, Sloan P, Thavaraj S. HPV Specific Testing: A Requirement for Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma Patients. *Head Neck Pathol*. 2012;6(SUPPL. 1):83–90.
100. Coutlee F, Rouleau D, Ferenczy A, Franco E. The Laboratory Diagnosis of Genital Human Papillomavirus Infections. *Can J Infect Dis Med Microbiol* [Internet]. 2005;16(2):83–91. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/cjidmm/2005/798710/abs/>
101. Kim KY, Lewis JS, Chen Z. Current status of clinical testing for human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Pathol Clin Res* [Internet]. 2018 Oct;4(4):213–26. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cjp2.111>
102. Mirghani H, Amen F, Moreau F, Guigay J, Ferchiou M, Melkane AE, et al. Human papilloma virus testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: What the clinician should know. *Oral Oncol* [Internet]. 2014 Jan;50(1):1–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837513007173>
103. Bishop JA, Lewis JS, Rocco JW, Faquin WC. HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck: An update on testing in routine pathology practice. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2015 Sep;32(5):344–51. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740257015000143>
104. Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reyniès A, Rickman D, Thomas E, et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Apr 15;126(8):1882–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.24911>
105. Smith DF, Maleki Z, Coughlan D, Gooi Z, Akpeng B, Ogawa T, et al. Human papillomavirus status of head and neck cancer as determined in cytologic specimens using the hybrid-capture 2 assay. *Oral Oncol* [Internet]. 2014 Jun;50(6):600–4. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837514000475>

106. Kerr DA, Pitman MB, Sweeney B, Arpin RN, Wilbur DC, Faquin WC. Performance of the Roche cobas 4800 high-risk human papillomavirus test in cytologic preparations of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2014 Mar;122(3):167–74. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncy.21372>
107. Roy-Chowdhuri S, Krishnamurthy S. The role of cytology in the era of HPV-related head and neck carcinoma. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2015 Jul;32(4):250–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740257014001130>
108. Perrone F, Gloghini A, Cortelazzi B, Bossi P, Licitra L, Pilotti S. Isolating p16-positive/HPV-negative Oropharyngeal Cancer. *Am J Surg Pathol* [Internet]. 2011 May;35(5):774–7. Available from: <http://journals.lww.com/00000478-201105000-00022>
109. Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Huang S, Hui A, et al. Comparative Prognostic Value of HPV16 E6 mRNA Compared With In Situ Hybridization for Human Oropharyngeal Squamous Carcinoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2009 Dec 20;27(36):6213–21. Available from: <http://www.nature.com/articles/bjc201442>
110. van Houten VMM, Snijders PJF, van den Brekel MWM, Kummer JA, Meijer CJLM, van Leeuwen B, et al. Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* [Internet]. 2001 Jul 15;93(2):232–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.1313>
111. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* [Internet]. 2002 Feb 27;21(10):1510–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/1205214>
112. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Jul;363(1):24–35. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0912217>

113. Lewis JS, 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* [Internet]. 2010 Aug;34(8):1088–96. Available from: <http://journals.lww.com/00000478-201008000-00002>
114. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol* [Internet]. 2011 Apr;64(4):308–12. Available from: <http://jcp.bmj.com/lookup/doi/10.1136/jcp.2010.088450>
115. Junor E, Kerr G, Oniscu A, Campbell S, Kouzeli I, Gourley C, 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* [Internet]. 2012 Jan 6;106(2):358–65. Available from: <http://www.nature.com/articles/bjc2011542>
116. Begum S, Gillison ML, Nicol TL, Westra WH. Detection of Human Papillomavirus-16 in Fine-Needle Aspirates to Determine Tumor Origin in Patients with Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2007 Feb 15;13(4):1186–91. Available from: <http://clincancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1078-0432.CCR-06-1690>
117. Pai RK, Erickson J, Pourmand N, Kong CS. p16 INK4A immunohistochemical staining may be helpful in distinguishing branchial cleft cysts from cystic squamous cell carcinomas originating in the oropharynx. *Cancer Cytopathol* [Internet]. 2009 Apr 25;117(2):108–19. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cncy.20001>
118. Cao D, Begum S, Ali SZ, Westra WH. Expression of p16 in benign and malignant cystic squamous lesions of the neck. *Hum Pathol* [Internet]. 2010 Apr;41(4):535–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817709003530>
119. Centers for Disease Control and Prevention. How To Use A Dental Dam As A Barrier For Oral Sex [Internet]. 2016. Available from: <https://www.cdc.gov/condomeffectiveness/Dental-dam-use.html>

120. Guo T, Eisele DW, Fakhry C. The Potential Impact of Prophylactic HPV Vaccination on Oropharynx Cancer. *Cancer*. 2016;122(15):2313–23.
121. Einstein MH, Takacs P, Chatterjee A, Sperling RS, Chakhtoura N, Blatter MM, et al. Comparison of long-term immunogenicity and safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine and HPV-6/11/16/18 vaccine in healthy women aged 18-45 years: End-of-study analysis of a Phase III randomized trial. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 2014 Dec 2;10(12):3435–45. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.4161/hv.36121>
122. FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 May 10;356(19):1915–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17494925>
123. Herrero R, Wacholder S, Rodríguez AC, Solomon D, González P, Kreimer AR, et al. Prevention of persistent human papillomavirus infection by an HPV16/18 vaccine: a community-based randomized clinical trial in Guanacaste, Costa Rica. *Cancer Discov* [Internet]. 2011 Oct;1(5):408–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22586631>
124. Hildesheim A, Herrero R, Wacholder S, Rodriguez AC, Solomon D, Bratti MC, et al. Effect of human papillomavirus 16/18 L1 viruslike particle vaccine among young women with preexisting infection: a randomized trial. *JAMA* [Internet]. 2007 Aug 15;298(7):743–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699008>
125. Herrero R, Quint W, Hildesheim A, Gonzalez P, Struijk L, Katki HA, et al. Reduced Prevalence of Oral Human Papillomavirus (HPV) 4 Years after Bivalent HPV Vaccination in a Randomized Clinical Trial in Costa Rica. *PLoS One*. 2013;8(7).
126. Graham DM, Isaranuwatthai W, Habbous S, de Oliveira C, Liu G, Siu LL, et al. A cost-effectiveness analysis of human papillomavirus vaccination of boys for the prevention of oropharyngeal cancer. *Cancer* [Internet]. 2015 Jun 1;121(11):1785–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25867018>

127. Mirghani H, Jung AC, Fakhry C. Primary, secondary and tertiary prevention of human papillomavirus-driven head and neck cancers. *Eur J Cancer*. 2017;78:105–15.
128. Holzinger D, Wichmann G, Baboci L, Michel A, Höfler D, Wiesenfarth M, et al. Sensitivity and specificity of antibodies against HPV16 E6 and other early proteins for the detection of HPV16-driven oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2017;140(12):2748–57.
129. Castle PE. Teaching Moment: Why Promising Biomarkers Do Not Always Translate Into Clinically Useful Tests. *J Clin Oncol*. 2014;32(4):359–61.
130. Ahn SM, Chan JYK, Zhang Z, Wang H, Khan Z, Bishop JA, et al. Saliva and Plasma Quantitative Polymerase Chain Reaction– Based Detection and Surveillance of Human Papillomavirus– Related Head and Neck Cancer. *JAMA Otolaryngol - Head Neck Surg*. 2014;140(9):846–54.
131. Blanco RGF, Califano J, Messing B, Richmon J, Liu J, Quon H, et al. Transcervical ultrasonography is feasible to visualize and evaluate base of tongue cancers. *PLoS One*. 2014;9(1):1–6.
132. Fakhry C, Rosenthal BT, Clark DP, Gillison ML. Associations between oral HPV16 infection and cytopathology: Evaluation of an oropharyngeal “pap-test equivalent” in high-risk populations. *Cancer Prev Res*. 2011;4(9):1378–84.