

Tesis doctoral

---

Departament de Cirurgia

VIRUS PAPILOMA HUMÀ  
EN EL CARCINOMA DE CAP I COLL

---

Adaia Valls Ontañón

Coro Bescós  
Guillermo Raspall  
Director

## RESUMEN

El carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello es una neoplasia maligna que deriva del epitelio escamoso y se caracteriza por su etiopatogenia multifactorial. A pesar de que el tabaco y el alcohol son los factores de riesgo más extendidos, actualmente es también reconocida la relación del virus papiloma humano (VPH) con el carcinoma escamoso de cabeza y cuello (CECC), aunque su impacto real aún está en estudio. Su incidencia, pronóstico e implicaciones terapéuticas permanecen todavía en controversia.

Por ello, hemos desarrollado el presente estudio a fin de demostrar la relación del VPH con el CECC, el cual consiste en la valoración de 156 pacientes tratados en la Unidad de Oncología de Cabeza y Cuello del Hospital Vall d'Hebron desde noviembre de 2009 hasta diciembre de 2010. Se han recogido los datos epidemiológicos, clínicos e histológicos de cada paciente, se han agrupado los pacientes según el resultado para el VPH y a continuación se han comparado estadísticamente los dos grupos.

Los resultados han demostrado que el CECC VPH+ es más frecuente en orofaringe, que los hombres tienen más incidencia de estos tumores, que son pacientes más jóvenes y menos fumadores y/o bebedores, que tienen más afectación ganglionar cervical (N2) y que los positivos con tinción inmunohistoquímica a p16 tienen mejor pronóstico.

En conclusión, nuestro estudio ha reflejado una relación epidemiológica entre el CECC y el VPH, y que el perfil del paciente VPH+ difiere del clásico paciente fumador y/o bebedor. A partir del estudio, sugerimos un protocolo de detección de VPH en pacientes diagnosticados de CECC.

## **ABSTRACT: European Certificate**

Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC) is a malignancy derived from squamous epithelium and is characterized by its multifactorial etiology. Although tobacco and alcohol are the most common risk factors, it is now also accepted the relationship between human papilloma virus (HPV) and HNSCC. Its true impact is still under study; its incidence, prognosis and therapeutic implications are still in dispute.

Therefore, we have developed this study to demonstrate the relationship between HPV and HNSCC, which assesses 156 patients treated in the Head and Neck Oncology Unit at the Vall d'Hebron Hospital from November 2009 to December 2010. We collected epidemiological, clinical and histological data of each patient. Patients were grouped according to the result to HPV, and then both groups were statistically compared.

It has been shown that HNSCC HPV + are more frequent in the oropharynx, men have a higher incidence of these tumours, patients are usually less smokers and / or drinkers, they have a higher cervical lymph node stage (N2) and patients with positive p16 staining have better prognosis.

In conclusion, our study indicates an epidemiological link between HPV and HNSCC. Furthermore, +HPV patient's profile differs from the classical profile of the smoker and / or drinker patient. From the study, we suggest a HPV detection protocol for patients diagnosed with HNSCC.

## INTRODUCCIÓN

La oncología de cabeza y cuello es la patología que representa mayor implicación en el Servicio de Cirugía Oral y Maxilofacial del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona.

Su pronóstico depende del estadiaje de la enfermedad tumoral y del estado general del paciente en su fase inicial de diagnóstico, y en función de éstos, los pacientes reciben terapias que combinan cirugía con amplias resecciones que pueden requerir reconstrucción del defecto quirúrgico, quimioterapia y radioterapia<sup>1</sup>.

Clásicamente, los factores de riesgo asociados al Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello<sup>2</sup> han sido el consumo de tabaco y alcohol.

Sin embargo, estos factores de riesgo parece ser que en nuestra población han empezado a disminuir de forma importante en los hombres, y contrariamente en la población de mujeres ha aumentado ligeramente [1]. En consecuencia, los tumores secundarios a estos hábitos tóxicos han disminuido, en especial los de cavidad oral, laringe e hipofaringe.

Paralelamente, estudios epidemiológicos desarrollados en Estados Unidos y en países del norte de Europa han detectado una disminución de la incidencia de los carcinomas asociados al tabaco y al alcohol y un incremento en la incidencia de aparición de carcinomas en relación a la infección por el Virus Papiloma Humano<sup>3</sup> como elemento relacionado con la carcinogénesis [2,3]. Estos últimos están localizados más frecuentemente en la orofaringe (región amigdalар y base de lengua), se desarrollan en pacientes sin antecedentes en el consumo de tabaco y alcohol, tienen un predominio poco claro por el sexo masculino y se presentan a una edad inferior a la habitual para los CECC.

Las diferencias en relación a los factores de riesgo y las características clínicas de los pacientes VPH positivos tienen también su reflejo en el pronóstico de la enfermedad, existiendo un amplio consenso en la literatura que señala un mejor pronóstico para este grupo de pacientes [4]. Esto podría tener una importante



Imagen 1: resección de un carcinoma de mandíbula con invasión a tejidos blandos

<sup>1</sup> QT= Quimioterapia y RT= Radioterapia

<sup>2</sup> CECC= Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello, considerando el tracto aéreo-digestivo superior

<sup>3</sup> VPH= Virus Papiloma Humano

repercusión en el planteamiento terapéutico de este grupo de pacientes, ya que han demostrado una especial sensibilidad al tratamiento con QT y RT, lo que supondría una gran novedad en el campo de la oncología de cabeza y cuello.

Existen estudios publicados que analizan la incidencia de carcinomas escamosos de orofaringe relacionados con el VPH en Estados Unidos o en países del norte de Europa que indican que superarían el 60% del total [2,3,5]. Sin embargo, no existen estudios publicados realizados en nuestro entorno geográfico, aunque algunos estudios preliminares hablan de una incidencia del 20-30%.

En nuestro centro, hemos podido observar desde hace unos años un posible cambio en las características de los pacientes afectados de CECC, con una tendencia al aumento de enfermos sin los factores de riesgo clásicos (tabaco y alcohol) y más jóvenes de lo habitual. Este cambio de tendencias junto a la confirmación en la literatura de la existencia de un factor de riesgo cada vez más influyente en la etiopatogenia de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello como es el VPH, hizo decidirnos a indagar en este nuevo modelo de tumor y realizar un estudio en los pacientes presentados en el Comité de Tumores de Cabeza y Cuello del Hospital Universitario Vall d'Hebron, nuestro centro del trabajo.

# CARCINOMA ESCAMOSO DE CABEZA Y CUELLO

## DESCRIPCIÓN

En la región de cabeza y cuello el Carcinoma de Células Escamosas<sup>4</sup> es el tipo histológico de tumor maligno más frecuente, representando el 90% de los tumores de cavidad oral, laringe y faringe [6]. Se origina en el epitelio de revestimiento escamoso pluriestratificado de las líneas del tracto aéreo-digestivo alto y es característica su etiopatogenia multifactorial, aunque destaca como factor etiológico el abuso de tabaco y alcohol.

Los pacientes afectados de CECC requieren un diagnóstico y estadificación precisos, así como un abordaje multidisciplinar para determinar el tratamiento y seguimiento más adecuados, considerando que el manejo de estos pacientes puede ser, sobretodo en estadíos avanzados, un reto terapéutico.

## EPIDEMIOLOGÍA

El CECC es la quinta localización más frecuente de cáncer a nivel mundial, y en Asia central representa la neoplasia más común. De hecho, se diagnostican aproximadamente medio millón de individuos anualmente a nivel mundial [6]. La mayoría de diferencias epidemiológicas entre poblaciones vienen determinadas según la prevalencia de los factores de riesgo en cada población.

Los hombres resultan significativamente más afectados que las mujeres con un rango de 2:1 a 4:1, dependiendo del país estudiado. La incidencia en el sexo masculino excede de 20/100,000 en las regiones de Francia, Hong Kong, India, Este y Centro de Europa, España, Italia, Brasil y en la comunidad afro-americana de Estados Unidos [7].

Destacaremos también la diferencia en localizaciones según los países y, así, en la India existe la incidencia más elevada de tumores de cavidad oral y lengua (relacionado con el hábito de mascar nuez de betel) y en Hong Kong de tumores nasofaríngeos (relacionado con la infección por el virus Epstein-Barr) [7].

En la siguiente tabla, publicada por el National Institute of Dental and Craniofacial Research en marzo del 2010, podemos observar los ratios de cáncer oral por cada 100,000 individuos según sexo y raza en Estados Unidos[8].

---

<sup>4</sup> Carcinoma de Células Escamosas =CCE

Race	Gender	All Ages	0 to 19	20 to 29	30 to 39	40 to 49	50 to 59	60 to 69	70 to 79	> 80
<b>All Races</b>	All	10.5	0.2	0.8	2.4	8.7	21.7	33.9	40.2	40.0
	Male	15.5	0.2	0.8	2.8	12.7	33.8	51.9	58.9	59.4
	Female	6.1	0.2	0.9	1.9	4.7	10.2	17.9	26.0	29.4
<b>White</b>	All	10.6	0.2	0.8	2.1	8.5	21.8	34.7	41.7	41.2
	Male	15.7	0.2	0.7	2.5	12.5	33.8	52.7	60.7	62.0
	Female	6.1	0.2	0.8	1.7	4.4	10.1	18.4	27.0	30.0
<b>Black</b>	All	10.7	0.3	0.9	2.3	10.2	25.9	35.8	37.0	27.6
	Male	17.2	0.4	0.8	2.7	14.6	43.2	61.0	61.6	43.4
	Female	5.7	0.2	0.9	2.0	6.2	11.3	16.2	20.5	19.5
<b>American Indian/ Alaska Native</b>	All	7.4	0.1	0.5	2.1	6.6	17.5	28.9	22.6	16.6
	Male	9.7	0.0	0.3	3.1	8.8	24.7	39.5	29.0	15.2
	Female	5.3	0.1	0.6	1.0	4.6	10.9	19.7	17.4	18.5
<b>Asian or Pacific Islander</b>	All	7.9	0.2	1.3	3.7	8.1	15.0	23.4	25.1	31.2
	Male	10.9	0.2	1.2	4.2	11.5	21.8	34.4	36.0	35.6
	Female	5.5	0.2	1.3	3.2	5.1	9.1	14.2	17.2	28.2
<b>Hispanic</b>	All	6.1	0.2	0.5	1.3	4.4	11.4	20.1	25.4	27.8
	Male	9.2	0.2	0.5	1.5	6.1	17.3	32.9	38.7	39.7
	Female	3.6	0.2	0.6	1.0	2.7	5.9	9.2	15.6	20.9
<b>White Hispanic</b>	All	6.3	0.2	0.5	1.3	4.6	11.7	20.4	25.6	28.2
	Male	9.3	0.2	0.5	1.6	6.3	17.7	33.4	38.8	40.3
	Female	3.7	0.2	0.6	1.1	2.8	6.0	9.4	15.7	21.2
<b>White Non- Hispanic</b>	All	11.3	0.2	0.9	2.4	9.4	23.5	36.8	43.6	42.3
	Male	16.7	0.2	0.9	2.9	14.1	36.5	55.4	63.2	63.9
	Female	6.5	0.2	0.9	1.9	4.8	10.8	19.8	28.4	30.7

Tabla 1: ratios de cáncer oral por cada 100,000 individuos según sexo y raza. National Institute of Dental and Craniofacial Research. Estados Unidos. Marzo 2010.

En Estados Unidos los CECC representan el 3.3% de todos los tumores malignos. Se estima que anualmente 48,010 americanos desarrollan CECC y que 11,260 fallecen a causa de ello [9]. La incidencia en hombres afro-americanos entre los años 1987-1991 fue aproximadamente un 50% mayor que en americanos blancos. Además, los hombres afro-americanos presentaban más probabilidad de debutar con metástasis a distancia y la enfermedad era de mayor mortalidad [10]. En estudios posteriores se ha visto que esta gran disparidad podría estar asociada a la mayor positividad para VPH en la población blanca estadounidense (34%) en comparación con la población afro-americana (4%), ya que si se compara la población blanca y la africana afectada de CECC no portadora de VPH, la supervivencia es la misma [11].

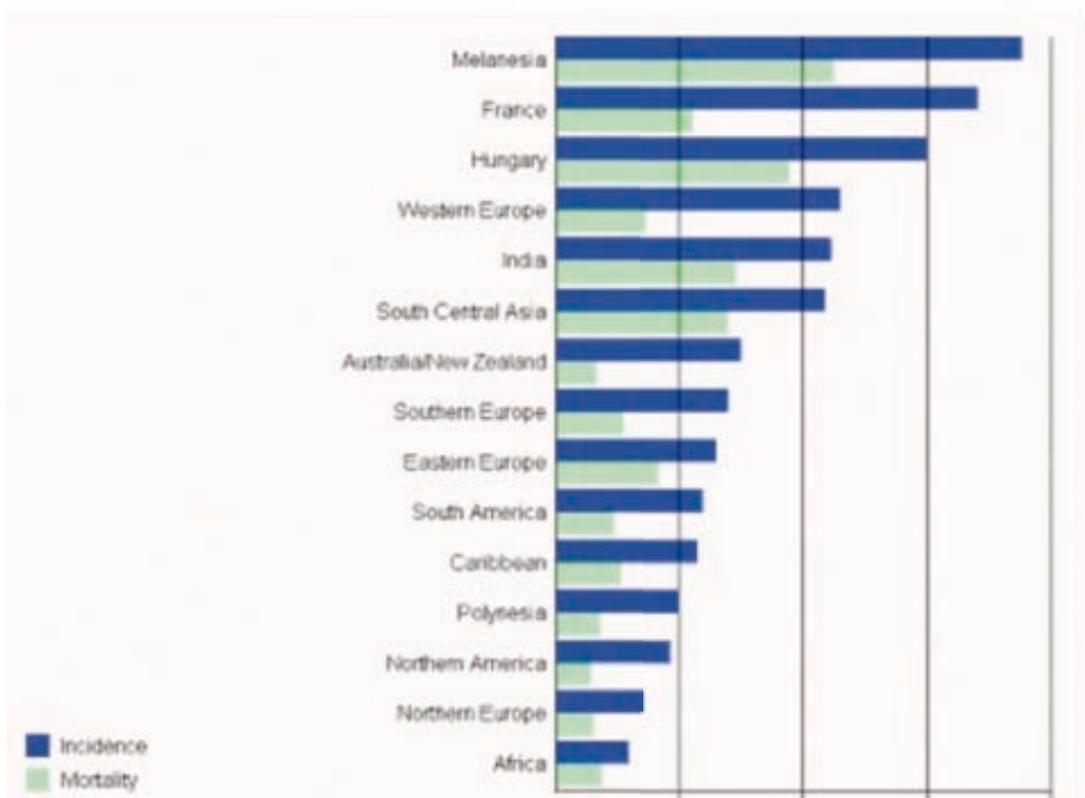


Tabla 2: tasas de incidencia y mortalidad de tumores de cavidad oral y orofaríngea, para todas las edades en hombres en Estados Unidos.

## FACTORES DE RIESGO

Se estima que el tabaco y el alcohol son los principales factores de riesgo de CECC en el 80% de los casos [1,7]. Ambos pueden actuar como agentes carcinogénicos en el tracto aéreo-digestivo superior produciendo alteraciones genéticas, como mutaciones en el gen supresor tumoral p53<sup>5</sup>.

Otros factores de riesgo son las infecciones virales, la exposición ocupacional, la radiación, los factores dietéticos y la propia susceptibilidad genética. La prevalencia relativa de cada uno de estos factores de riesgo contribuye a las variaciones de distribución de CECC observadas en las distintas áreas geográficas.

- ✓ **Tabaco:** los fumadores de cigarros y pipas tienen un riesgo 5-25 veces mayor de padecer algún tipo de CECC. Mascar tabaco también es un factor de riesgo para desarrollar tumores en cavidad oral y faringe. Parece haber una relación incremental relacionada con la dosis, la edad de inicio en el consumo de tabaco y el período total de tiempo que el paciente ha estado fumando.

<sup>5</sup> La proteína p53 en condiciones normales controla el ciclo celular de la fase G0/G1 a la fase S, y además funciona como supresor tumoral activando la apoptosis y los enzimas de reparación del ADN cuando existe una agresión celular.

Por otra parte, los fumadores pasivos también presentan mayor riesgo de desarrollar CECC que las personas no expuestas al humo del tabaco [12-17].

- ✓ Alcohol: aunque a menudo es difícil separar los efectos del alcohol de los del tabaco, numerosos estudios han demostrado de forma consistente que el consumo de alcohol incrementa, independientemente del consumo de tabaco, el riesgo de padecer un CECC. Asimismo, tabaco y alcohol tienen efectos interactivos y multiplicativos [12,18]. El efecto del alcohol es dosis dependiente [15]. Finalmente, recordar que también existe evidencia en que la susceptibilidad genética juega un papel importante, en particular en los polimorfismos genéticos de la alcohol deshidrogenasa (ADH) y de la aldehído deshidrogenasa (ALDH) [19].

- ✓ Mascar nuez de betel: es un hábito muy común en algunas regiones de Asia y un factor de riesgo añadido e independiente para desarrollar un CECC. Sus efectos son sinérgicos al del tabaco y el alcohol [20].



Imagen 2: nuez de betel

- ✓ Infecciones virales: las infecciones virales crónicas pueden asociarse a CECC, posiblemente interfiriendo en la función de los genes supresores tumorales. Los virus también pueden participar como cofactores facilitando la activación, amplificación y sobreexpresión de los oncogenes ya existentes en los tejidos neoplásicos [21-23].

- ☞ El Virus Epstein-Barr se ha asociado con los tumores nasofaríngeos, sobre todo en el Sur de China. También es el agente etiológico primario de la leucoplasia oral vellosa, aunque su relación con la posible evolución a CCE es incierta y discutida por muchos autores.

- ☞ El Virus Papiloma Humano, como desarrollaremos más adelante, se relaciona también con los tumores de orofaringe.

- ☞ La relación de los CECC con el Virus Herpes Simple es más discutida, pero defendida por algunos.

- ☞ Los pacientes con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana<sup>6</sup> presentan mayor prevalencia de CECC, como el linfoma no Hodgkin y algunos CCE de cavidad oral.

- ✓ Exposición ocupacional: constan registros de CECC secundarios a algunos agentes de limpieza que contienen percloroetileno, al asbesto, a algunos

<sup>6</sup> VIH= Virus de la Inmunodeficiencia Humana

pesticidas,... entre muchos otros productos a los que estamos expuestos de forma cotidiana o laboral [24].

- ✓ Radiación: ésta favorece la aparición de tumores malignos en tiroides y glándulas salivares, y carcinomas escamosos y sarcomas en las zonas irradiadas [25]. Aunque la sospecha es real, el tiempo de latencia es largo y el riesgo de malignizar bajo.
- ✓ Radiación actínica: ésta es relevante en las lesiones malignas de piel y labio, sobre todo.
- ✓ Déficit de hierro: el síndrome de Plummer-Vinson, un déficit de hierro crónico, se ha relacionado con el aumento de riesgo de CCE de base de lengua, orofaringe y esófago.
- ✓ Déficit de vitamina A: se cree que la vitamina A juega un papel protector en el desarrollo de enfermedades



Imagen 3: síndrome de Plummer-Vinson: lengua roja y a menudo asociado a queilitis angular

pre malignas y malignas de la cavidad oral.<sup>7</sup>

- ✓ Dieta: varios estudios han sugerido un aumento de CECC en altos consumidores de conservas que contienen nitritos, de huevos y de carne roja. En cambio, se han propuesto algunos alimentos protectores como: leche, verduras, frutas, zinc y té verde [26].
- ✓ Factores genéticos: solamente una fracción de los pacientes expuestos al tabaco y al alcohol padecen CECC, lo que sugiere que la susceptibilidad genética juega un papel importante en la carcinogénesis. Varios estudios demuestran que:
  - ☞ Los familiares de pacientes con CECC tienen más probabilidad de desarrollar CECC [27].
  - ☞ Los pacientes con CECC tienen más probabilidad de desarrollar un segundo tumor primario si alguno de sus familiares padece CECC o carcinoma pulmonar [28].
  - ☞ Los pacientes portadores de enfermedades con alteraciones genéticas, como la anemia de Fanconi<sup>7</sup>, tienen más probabilidad de desarrollar un CECC.

<sup>7</sup> Anemia de Fanconi: enfermedad hereditaria que cursa con un descenso progresivo de las tres series celulares sanguíneas

- ✓ Otros: escasa higiene oral, fumar marihuana y ser portador de una prótesis mal ajustada también se ha asociado con un riesgo incrementado de sufrir un CECC.

## HISTOPATOLOGÍA

El término cáncer incluye un conjunto de enfermedades en las cuales el organismo produce un exceso de células malignas con crecimiento y división celular descontrolados, invasión del tejido circundante y que en ocasiones origina metástasis a distancia.

Los CECC pueden ser de estirpe epitelial, mesenquimal o hematolímfoide. En nuestro trabajo nos centramos en los carcinomas escamosos de cabeza y cuello.

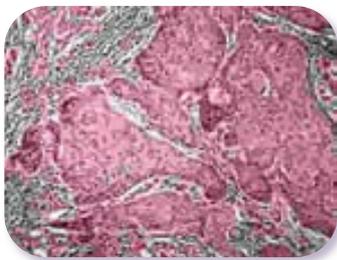


Imagen 4: histología del CECC de células atípicas con diferenciación escamosa variable que desde el epitelio de superficie de la mucosa invaden corion submucoso y muscular, a menudo alcanzando cartílago o hueso, y con probable permeación vascular y/o perineural

El CCE es un tumor maligno que deriva del epitelio escamoso de superficie, en el que se observa diferenciación escamosa en forma de puentes intercelulares (desmosomas) y/o formación de queratina.

Histológicamente se caracteriza por una proliferación

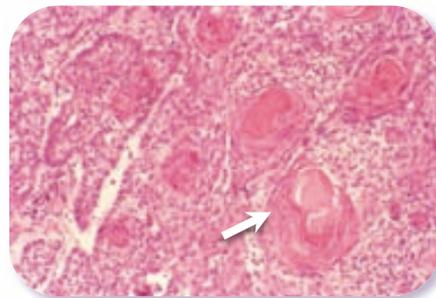


Imagen 5: presencia de queratina en un CCE

En el estudio anatomopatológico de la pieza quirúrgica, la invasión perineural y angiolinfática, la afectación extracapsular de los ganglios cervicales y la afectación de los márgenes quirúrgicos son signos adicionales de malignidad.



Imágenes 6 y 7: invasión CCE perineural

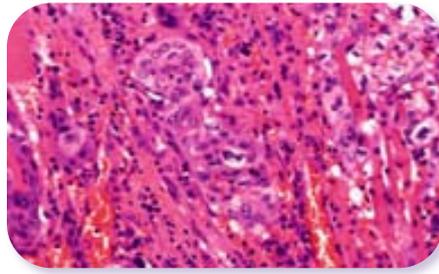
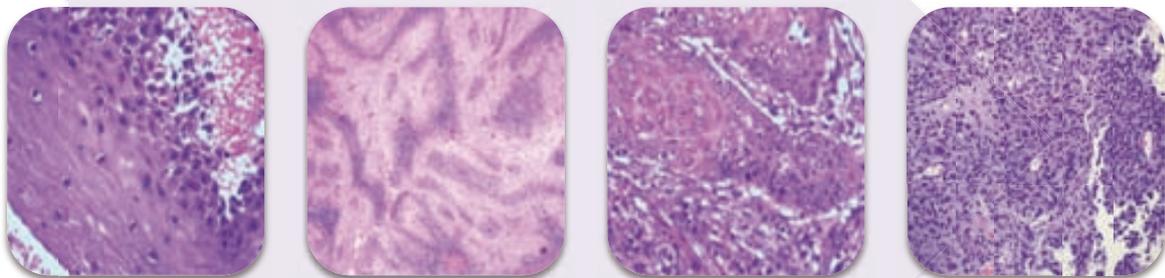


Imagen 8: permeación vascular

## Clasificación de los CCE

Los CCE son tradicionalmente clasificados en bien, moderada y pobremente diferenciados. Los CCE bien diferenciados se asemejan estrechamente al epitelio escamoso normal. Los moderadamente diferenciados contienen un pleomorfismo nuclear distinto y actividad mitótica, incluyendo mitosis anormales, por lo que en general hay menos queratinización. En los CCE pobremente diferenciados las células inmaduras predominan, con numerosas mitosis típicas y atípicas, y mínima queratinización.



Imágenes 9, 10, 11 y 12: (9) Epitelio normal, (10) CCE bien, (11) moderada y (12) y pobremente diferenciados respectivamente

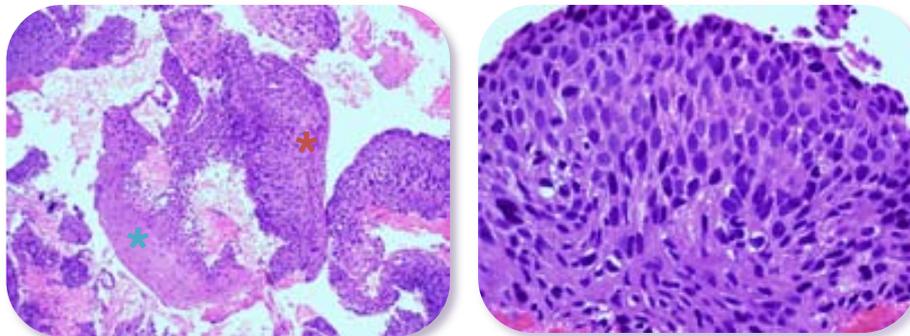
El crecimiento del tumor en la parte delantera invasiva puede mostrar un patrón expansivo, un patrón infiltrativo, o ambos. El patrón de crecimiento expansivo se caracteriza por presentar grandes islas tumorales con márgenes bien definidos que empujan hacia el exterior y se asocia con un mejor pronóstico. El patrón de crecimiento infiltrante se caracteriza por presentar de forma dispersa e irregular

pequeños cordones o células tumorales individuales, con márgenes infiltrantes mal definidos, y además se asocia con un curso de la enfermedad más agresivo.

## Lesiones premalignas

Debemos destacar que existen también una serie de cambios patológicos clínico-histológicos considerados como no malignos pero tipificados como lesiones premalignas.

Las displasias histológicamente se caracterizan por la presencia de mitosis y núcleos prominentes, sin invasión de la capa basal. Éstas progresan a cáncer invasivo en el 15-30% de los casos. No son consideradas lesiones malignas, pero cuando la lesión incluye todo el espesor mucoso hablamos de carcinoma in situ [29].



Imágenes 13 y 14: (13) comparación entre tejido normal\* y displásico\* y (14) detalle de una displasia (con mitosis y núcleos prominentes)

En la siguiente tabla se presenta el potencial de transformación maligna de las lesiones premalignas más relacionadas con el CECC

Lesión	Potencial de cancerización
Leucoplasia verrugosa proliferativa	xxxxxx
Eritroplasia	xxxxx
Fibrosis oral submucosa	xxxxx
Eritroleucoplasia	xxxx
Leucoplasia granular	xxxx
Queratosis laríngea	xxx
Queilosis actínica	xxx
Leucoplasia gruesa plana	xx
Lengua roja: Síndrome de Plummer-Vinson	xx
Queratosis por tabaco sin humo	x
Liquen plano (formas erosivas)	x
Leucoplasia delgada plana	+/-

Tabla 3: lesiones premalignas orales y sus potenciales de malignización respectivos

- ✓ Leucoplasia: está caracterizada por una hiperqueratosis y usualmente se asocia a una hiperplasia epitelial subyacente. En ausencia de cambios displásicos subyacentes, la probabilidad de malignizar es inferior al 5% [29]. La leucoplasia verrugosa proliferativa, descrita por Hansen [30], es un tipo muy agresivo de lesión leucoplásica que muestra rasgos morfológicos y citológicos similares a los de CCE, salvo invasión. Se inicia como una lesión simple y de crecimiento lento, que tiende a extenderse y puede llegar a ser multifocal y no homogénea. Estas lesiones tienden a ser persistentes e irreversibles, refractarias al tratamiento y con alta tendencia a la malignización: 50-70%. Su origen es desconocido, pero se cree que es una enfermedad de origen multifactorial, y entre los factores de riesgo se encuentran el tabaco, alcohol, VPH, hongos como la candidiasis, ... por lo que el primer paso debe ser ayudar al paciente a abandonar ciertos hábitos que pueden aumentar el riesgo de transformación maligna (tabaco, alcohol, etc.).



Imagen 15: leucoplasia de vientre lingual



Imagen 16: histología leucoplasia

- ✓ Eritroplasia: se caracteriza por manchas eritematosas superficiales adyacentes a mucosa sana. Normalmente se asocia a displasia epitelial subyacente con carcinoma in situ o tumor invasivo en al menos el 40% de los casos [29].



Imagen 17: eritroplasia paladar



Imagen 18: fibrosis oral submucosa

- ✓ Fibrosis oral submucosa: lesión formada por una reacción inflamatoria yuxt-epitelial y una fibrosis progresiva de los tejidos submucosos, incluyendo la

lámina propia y el tejido conectivo profundo. Suele asociarse al hábito de mascar nuez de betel [15].

## CLASIFICACIÓN

La afectación tumoral en la región de cabeza y cuello, excluyendo la piel y las glándulas salivares, incluye 4 áreas básicas:

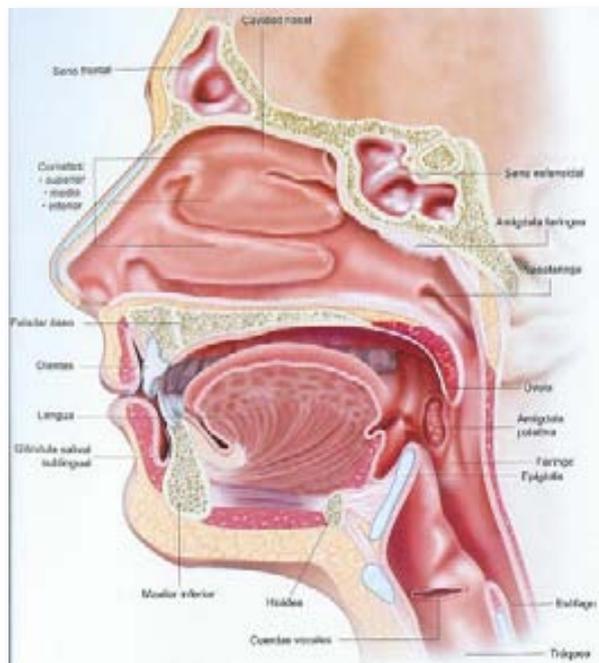


Imagen 19: división anatómica de las áreas de afectación tumoral en cabeza y cuello

- ✓ Cavidad Oral: formada por labios, mucosa oral, lengua anterior, suelo de boca, paladar duro y encía. Es, junto a la laringe, la localización donde más frecuentemente hallamos un CECC.

Es importante señalar que el 75% de CCE orales surgen en el área que comprende el suelo de la boca, la mucosa adyacente lingual, el surco sublingual y la región retromolar. Esta región comprende solamente el 20% del total de la superficie mucosa oral. Esta zona de mayor susceptibilidad ha sido llamada como "área de drenaje". Es evidente, por tanto, que cualquier lesión premaligna en esta área debe ser considerada como de alto riesgo.



Imagen 20: área de drenaje considerada de alto riesgo

- ✓ Faringe: podemos dividirla en
  - ☞ Naso-faringe o cavum: desde la región posterior de la nariz hasta el paladar blando
  - ☞ Orofaringe o anillo de Waldeyer: incluye área amigdalara, base de lengua, paladar blando y pared faríngea posterior
  - ☞ Hipo-faringe: formada por senos piriformes, área postcricoides, y paredes lateral, inferior y posterior de la faringe
- ✓ Laringe: se encuentra dividida en 3 áreas
  - ☞ Supra-glótica
  - ☞ Glótica
  - ☞ Sub-glótica
- ✓ Cavidad nasal y senos paranasales: cavidad nasal y senos maxilares, etmoidales, esfenoidales y frontales.

## DIAGNÓSTICO

Cada paciente debuta con una clínica distinta dependiendo de la localización y extensión del tumor. Así, por ejemplo, los síntomas de presentación más habituales en tumoraciones de senos paranasales son la epistaxis y la obstrucción nasal unilateral.

En cambio, los afectos de una tumoración nasofaríngea suelen debutar con una masa cervical, u otros síntomas habituales como acufenos, pérdida de audición, dolor, etc.

Los pacientes con un carcinoma oral suelen presentar simplemente una masa o úlcera oral, pérdida o movilidad de dientes, sangrado, disfagia u odinofagia, dependiendo de dónde asiente el tumor.

Estos pacientes requieren extensas anamnesis y un exploración física con inspección y palpación. A veces la inspección debe ser indirecta mediante espejos o endoscopia.

Todas las sospechas diagnósticas serán confirmadas mediante:

- ✓ Estudio anatomopatológico para tipificar la histología del tumor
  - ☞ Biopsia
  - ☞ PAAF<sup>8</sup>
- ✓ Estudio de imagen para el estadiaje de la enfermedad
  - ☞ Ortopantomografía
  - ☞ Radiología convencional facial o de tórax
  - ☞ RM<sup>9</sup>
  - ☞ TC<sup>10</sup>
  - ☞ PET<sup>11</sup>



Imagen 21: CCE mucosa yugal



Imagen 22: PET de control en paciente con adenocarcinoma de parótida izquierda, al que se le realizó parotidectomía con linfadenectomía laterocervical y posteriormente QT y RT

<sup>8</sup> PAAF: Punción-Aspiración con Aguja Fina

<sup>9</sup> RM = Resonancia Magnética

<sup>10</sup> TC = Tomografía Computarizada

<sup>11</sup> PET: Tomografía por Emisión de Positrones

La extensión tumoral loco-regional (tumor primario y cadenas ganglionares cervicales) se estudia mediante técnicas de imagen tales como la RM o la TC. Una vez se ha iniciado el estudio con una técnica de imagen específica, es recomendable realizar los controles post-terapéuticos con la misma técnica de imagen, pues nos permite comparar y percibir pequeños cambios que puedan aparecer. La RM permite obtener un mejor contraste entre los tejidos, lo que facilita la delimitación de los márgenes tumorales y la detección de posibles extensiones a estructuras vecinas o a distancia (como invasión perineural o a base de cráneo). En la mayoría de los casos, no es necesario administrar contraste endovenoso. Sin embargo, en los pacientes portadores de materiales metálicos que no sean de titanio (marcapasos, implantes cocleares, clips metálicos,...) está contraindicado realizar RM, y además en los claustrofóbicos se precisa al menos una sedación. La TC adquiere la imagen de forma más rápida y por eso tiene menos artefactos por movimientos del paciente, como tragar saliva. Además, no suele dar problemas de claustrofobia. Es una técnica muy buena para el estudio de las cadenas ganglionares, pero requiere la administración de contraste endovenoso de forma sistemática. A igual experiencia del radiólogo y disponibilidad de las dos técnicas (TC y RM), la RM se considera de elección por las ventajas comentadas y por permitir en el mismo estudio valorar correctamente las cadenas ganglionares. La técnica de PET es un registro corporal que utilizamos en caso de sospecha de metástasis a distancia, o bien cuando las técnicas convencionales no son suficientemente resolutivas en los controles post-tratamiento, para discernir entre recidiva y cambios post-terapéuticos.

## ESTADIAJE

El estadiaje TNM (tumor, node and metastases) propuesto por la UICC (Union Internationale Contre le Cancer) y la AJCC (American Joint Committee on Cancer) se basa en el diagnóstico de extensión de la enfermedad antes del tratamiento [31]. Cuando tenemos los resultados anatomopatológicos definitivos postquirúrgicos, cambiamos la denominación a pTNM.

El estadiaje clínico se obtiene mediante la exploración física y las pruebas de imagen. Así pues, debemos estudiar el tamaño de la lesión, la extensión a ganglios linfáticos cervicales y las posibles metástasis a distancia.

## Tamaño del tumor primario (T)

- ✓ Tx: no puede evaluarse el tumor primario
- ✓ T0: no hay prueba de tumor primario
- ✓ Tis: carcinoma in situ
- ✓ T1: tumor de  $\leq 2$ cm en diámetro mayor
- ✓ T2: tumor  $>2$ cm pero  $\leq 4$ cm en diámetro mayor
- ✓ T3: Tumor  $>4$ cm en dimensión mayor
- ✓ T4a (labio): tumor que invade, a través del hueso cortical, nervio alveolar inferior, suelo de boca o piel facial.
- ✓ T4a (cavidad oral): tumor que invade las estructuras adyacentes: hueso cortical, músculos profundos extrínsecos de la lengua (geniogloso, hiogloso, palatogloso, y estilogloso), seno maxilar o piel.
- ✓ T4b (cavidad oral y labio): tumor que invade espacio masticatorio, placas pterigoideas, base de cráneo o envuelve la arteria carótida interna.

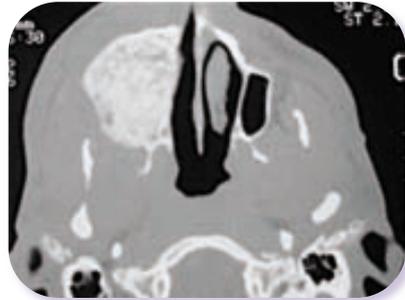


Imagen 23: TC de tumoración en maxilar superior derecho

## Ganglios linfáticos regionales (N)

Las principales zonas de drenaje linfático de la boca y orofaringe son los grupos ganglionares linfáticos submandibular y submentoniano (Nivel I) y yugulodigástrico (Nivel II).

Los vasos linfáticos de la encía por lo general drenan en la región submandibular, pero los de la región de los incisivos inferiores desembocan en los nodos submentonianos. La mayoría de los del paladar drenan al grupo yugulodigástrico pero algunos lo hacen al retrofaríngeo.

En la lengua hay un rico plexo linfático, el cual puede subdividirse en marginal y central. Los vasos marginales recogen el drenaje del tercio lateral del dorso lingual, del borde lateral y de parte del vientre lingual. Dichos vasos desembocan a los ganglios linfáticos submandibulares ipsilaterales. Los de la punta lingual desembocan en los ganglios submentonianos. Los vasos linfáticos centrales drenan a los ganglios submaxilares de ambos lados. Sin embargo, algunos de estos vasos pueden drenar directamente al grupo yugulodigástrico, y algunos pueden pasar

directamente a los ganglios yugulomohioideos. Los vasos de la zona de las papilas caliciformes y del tercio posterior de la lengua drenan a los grupos yugulodigástrico, yugulomohioide o intermedio, ya sea unilateral o bilateral. Por último, la mayoría de los vasos linfáticos de las amígdalas palatinas drenan a los ganglios yugulodigástricos.

Nivel I a	Grupo submentoniano	Nivel IV	Grupo yugular bajo (cervicales inferiores, supraclaviculares)
Nivel I b	Grupo submandibular	Nivel V	Triángulo posterior (espinales)
Nivel II	Grupo yugular alto (yugulodigástricos, cervicales altos)	Nivel VI	Compartimento anterior (prelaringeos, paratraqueales)
Nivel III	Grupo yugular medio (cervicales medios)		

Tabla 4: descripción de los niveles ganglionares cervicales

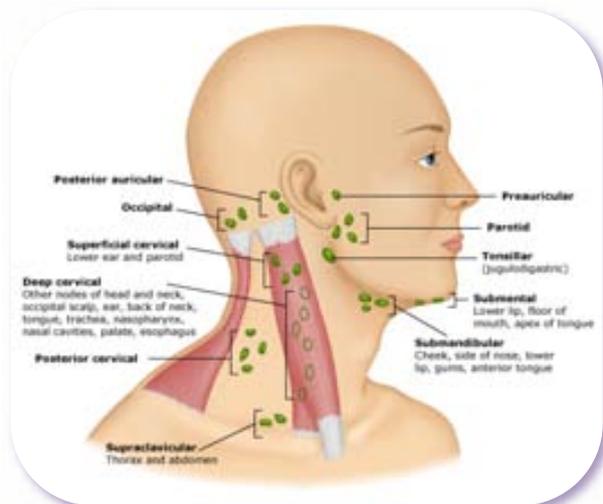


Imagen 24: grupos ganglionares cervicales



Imagen 25: Vaciamiento Ganglionar Cervical Supraomohioideo Izquierdo

La clasificación TNM a nivel ganglionar se rige por la siguiente nomenclatura:

- ✓ Nx: no se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales
- ✓ N0: no hay metástasis a ganglios linfáticos regionales
- ✓ N1: metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral, de  $\leq 3$ cm de dimensión mayor
- ✓ N2: metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral  $> 3$ cm pero  $\leq 6$ cm de dimensión mayor; o en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales, todos  $\leq 6$ cm de dimensión mayor; o en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales, todos  $\leq 6$ cm
- ✓ N2a: metástasis en un solo ganglio linfático ipsilateral  $> 3$ cm pero  $\leq 6$ cm de dimensión mayor

- ✓ N2b: metástasis en múltiples ganglios linfáticos ipsilaterales todos  $\leq 6$ cm de dimensión mayor
- ✓ N2c: metástasis en ganglios linfáticos bilaterales o contralaterales todos  $\leq 6$ cm
- ✓ N3: metástasis en un ganglio linfático  $> 6$ cm de diámetro

### Metástasis a distancia (M)

- ✓ Mx: no se pueden evaluar las metástasis a distancia
- ✓ M0: no hay metástasis a distancia
- ✓ M1: hay metástasis a distancia



Imagen 26: recidiva traqueal, por traqueostomía



Imagen 27: letálides: afectación cutánea

### Estadaje TNM

A partir de las anteriores clasificaciones, se obtiene el estadaje TNM como se detalla a continuación.

- ✓ Estadío 0: Tis N0 M0
- ✓ Estadío I: T1 N0 M0
- ✓ Estadío II: T2 N0 M0
- ✓ Estadío III: T1,T2,T3 N1 M0
- ✓ Estadío IV
  - ✓ A: T1,T2,T3 N2 M0 o T4a N0,N1,N2 M0
  - ✓ B: T1,T2,T3,T4 N3 M0 o T4b N1,N2,N3 M0
  - ✓ C: cualquier T, cualquier N, M1

	T1	T2	T3	T4	
N0	I	II			
N1	III				
N2	IVA				M0
N3	IVB				
	IVC				M1

Tabla 5: esquema TNM

## TRATAMIENTO

La mejor opción de tratamiento depende de la localización, el estadiaje, la resecabilidad del tumor y del estado general del paciente. El tratamiento del CECC es extremadamente complejo, no solamente por la variabilidad regional, sino también por las limitaciones anatómicas y la importancia de mantener la función masticatoria, deglutoria y fonatoria del paciente. Además, debemos destacar el impacto que producen las alteraciones anatómicas de esta región, ya que tienen una gran repercusión en las relaciones sociales y en la calidad de vida de los pacientes.

En consecuencia, es imperativa la coordinación de un equipo multidisciplinar formado por varios especialistas: cirujanos maxilofaciales y plásticos, otorrinolaringólogos, oftalmólogos, oncólogos médicos y radioterápicos, anatomopatólogos, radiólogos, rehabilitadores, equipo de enfermería, logopedas, psicólogos, nutricionistas, asistentes sociales, odontólogos y prostodoncistas, y otros especialistas que puedan ser necesarios según el tipo de tratamiento.

Para los CECC el tratamiento con cirugía y/o RT es la norma cuando la afectación es loco-regional en estadios iniciales. Sin embargo, la QT suele cobrar importancia en el tratamiento de pacientes con enfermedad loco-regional avanzada, junto a la RT y la cirugía [32].

Para facilitar la estrategia terapéutica de los pacientes afectados de CECC, es útil clasificarlos en 3 grupos:

- ✓ Enfermedad de estadiaje precoz, sin afectación ganglionar: estadios I y II (30-40%) ⇒ generalmente son tratados con cirugía y/o RT, dependiendo de la accesibilidad quirúrgica y de la morbilidad asociada a cada terapia. La supervivencia a los 5 años de estos pacientes se encuentra alrededor del 70-90%. Sin embargo, en un 20% de los pacientes fumadores es previsible que aparezca una segunda neoplasia en los siguientes 5 años.

En los pacientes tratados con cirugía primaria, estará indicado el tratamiento posterior con RT con o sin QT en función de los resultados obtenidos en la anatomía patológica definitiva en relación a la posible afectación de los márgenes u otros factores de riesgo como invasión perineural o linfovascular.

- ✓ Enfermedad avanzada loco-regionalmente, con afectación ganglionar: estadios III, IVa y IVb ⇒ deben abordarse con una terapia combinada de cirugía, RT y QT (de inducción, concomitante o adyuvante), dependiendo de las características de la enfermedad como la localización, la intención de preservar la funcionalidad del órgano y del estado general del paciente [33].
- ✓ Enfermedad con metástasis a distancia: estadio IVc y enfermedad recurrente ⇒ en los casos de enfermedad intratable, puede aplicarse tratamiento

paliativo con QT. Por otro lado, en los casos de recidiva, el tratamiento variará dependiendo de la terapia recibida anteriormente y de las características del tumor.

## Tratamiento quirúrgico

La cirugía es un pilar esencial para el tratamiento de los CECC. El objetivo principal de ésta es la resección tumoral loco-regional con la máxima preservación de la funcionalidad del órgano, pero intentando siempre obtener unos márgenes de resección libres. Para conseguir resultados óptimos es imprescindible realizar un riguroso estudio de extensión preoperatorio, así como planificar previa ejecución quirúrgica la vía de abordaje de la extirpación tumoral y ganglionar y, si es necesaria, la reconstrucción del defecto resultante.

La reconstrucción puede requerir un simple cierre primario, un cierre por segunda intención, o si el defecto es mayor, un colgajo regional, a distancia, o microvascularizado. Debemos destacar la importancia de la reconstrucción en estos pacientes para mantener una aceptable función masticatoria, deglutoria y fonatoria y una aceptable calidad de vida.

La extirpación radical del tumor debe implicar unos márgenes libres de al menos 10mm. Solamente se acepta como libre un margen menor a 10mm cuando se trata del periostio mandibular, el cual, si está indemne, puede considerarse como correcto y suficiente, y no es necesario resecaer hueso. La definición más aceptada de margen afecto es la utilizada por el Memorial Sloan-Kettering Cancer Center en el que se engloban, no sólo la invasión microscópica del margen por tumor, sino también cambios premalignos y carcinoma in situ en el margen [34-36]. El significado pronóstico de los márgenes de resección afectados del carcinoma oral fue ya publicado por Loree y Strong en 1990, demostrando que la media de recurrencia local se duplicaba en pacientes con márgenes afectados en comparación con los pacientes con márgenes no afectados microscópicamente en la resección quirúrgica [34].

Para conseguir dichos márgenes es de gran ayuda realizar biopsias intraoperatorias, que presentan una sensibilidad y especificidad del 90% aproximadamente.

Ante un margen quirúrgico afecto, las opciones terapéuticas son: la ampliación del margen, si es técnicamente factible, o bien RT postoperatoria (aunque no existe evidencia clínicamente significativa de que mejore la supervivencia) [32,34-36].

La reconstrucción debe planificarse para el mismo acto quirúrgico (reconstrucción primaria) y sus objetivos son:

- ✓ Restaurar el aspecto externo del paciente

- ✓ Proporcionar un buen cierre del defecto quirúrgico
- ✓ Separar las cavidades y los espacios anatómicos
- ✓ Evitar espacios muertos que condicionen infecciones
- ✓ Dar cobertura a las estructuras vitales
- ✓ Proporcionar un tejido sano que pueda recibir la RT complementaria sin interrupciones
- ✓ Restaurar al máximo las funciones del tracto aéreo-digestivo alto, como son la masticación, la deglución, la fonación y la respiración

Actualmente, los colgajos libres con técnicas microquirúrgicas suelen estar muy indicados en este tipo de defectos, dada su excelente vascularización, buena adaptación a los defectos tisulares complejos y a la baja morbilidad de la zona dadora debido a la utilización de injertos microvascularizados de vasos perforantes cada vez más sofisticados.

Para algunas resecciones y reconstrucciones mayores es necesaria la traqueotomía para prevenir posibles problemas de obstrucción de la vía aérea superior. En aquellos casos en que se prevea un apoyo nutricional prolongado, puede considerarse la colocación de una sonda nasogástrica o bien la realización de una gastrostomía percutánea o una yeyunostomía [34,37].

Los pacientes tratados de CECC (ya sea con cirugía, RT o QT) precisan de buena salud dental, por lo que se recomienda realizar el tratamiento dental conservador previamente y las exodoncias en el mismo acto quirúrgico. En caso de que las piezas dentales a extraer se encuentren en la zona tumoral, debemos proceder a la resección tumoral incluyendo las piezas dentales en la pieza quirúrgica.

El cuello N0 generalmente se trata quirúrgicamente, si está indicado, cuando la lesión primaria también se trata quirúrgicamente. La localización del primario y los patrones de drenaje dictan el tipo de vaciado a realizar, en general el supraomohioideo. Sin embargo, existe poca evidencia clínica significativa en cuanto al aumento de supervivencia al realizar un VGC electivo o profiláctico [38]. Actualmente la biopsia de ganglio "centinela" se ha impuesto en numerosos centros como la técnica de elección en el tratamiento cervical en los pacientes N0. La técnica ofrece el potencial de una cirugía segura basada en el drenaje linfático individual de cada paciente, mostrando muy buena sensibilidad en el diagnóstico de metástasis ocultas [39].

Ante la presencia de un ganglio afecto, se recomienda una disección cervical radical modificada (funcional) o selectiva en pacientes con un ganglio móvil localizado en la primera escala del drenaje linfático. La resección del tumor en continuidad con el vaciamiento cervical solamente está indicada en los tumores con infiltración profunda en los que existe continuidad entre el primario y los tejidos que van a ser

extirpados con el vaciamiento. Se recomienda RT adyuvante si existen múltiples ganglios afectos o bien extensión tumoral extracapsular de éstos.

Cuando la afectación cervical es clasificada como N2 o N3, la disección cervical radical o radical modificada es la norma, además de la administración de RT adyuvante.

Tabla 6: tipos de vaciamientos ganglionares cervicales

En algunas ocasiones, la extensión cervical debe considerarse irresecable: cuando existe invasión cutánea, vertebral, de la fascia cervical profunda, del plexo braquial, de la base del cráneo o de la arteria carótida. En esta última situación, puede considerarse la resección de la carótida con o sin reconstrucción de la misma, o la reducción del volumen tumoral con terapia adyuvante.

### Reconstrucción quirúrgica

En algunas ocasiones la rehabilitación protésica es una opción que debemos considerar, pero si existe tejido sano local y/o a distancia, se opta por la reconstrucción quirúrgica. Actualmente las nuevas tecnologías ofrecen cirugía robótica y virtual, estudios 3D, entre otros avances. Esto nos permite planificar previamente las cirugías, preformar las placas de reconstrucción, obtener guías de corte y localizar estructuras nobles con seguridad.



Imágenes 28 y 29: reconstrucción con un colgajo microvascularizado y un colgajo local, respectivamente

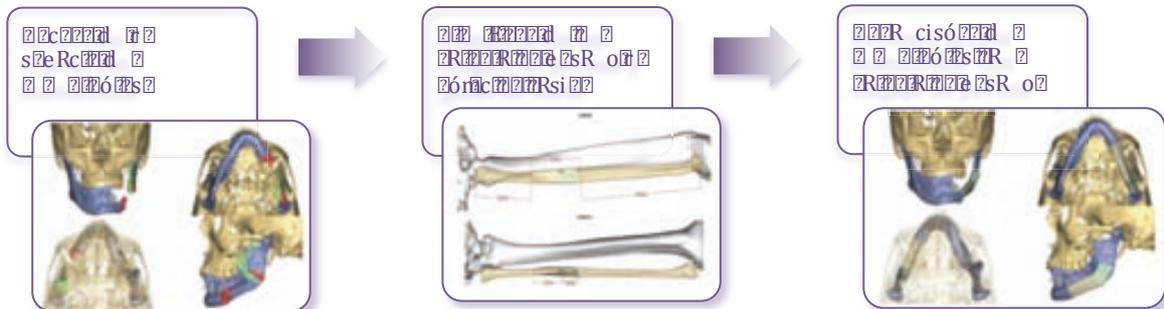


Imagen 30: planificación 3D de reconstrucción mandibular con colgajo microvascularizado de peroné

Existen múltiples opciones para reconstruir cada zona de forma anatómica y funcional, y debemos escoger específicamente para cada paciente la óptima. Por lo tanto, la planificación adecuada de la vía de abordaje, la exéresis y la reconstrucción son los pilares fundamentales de la cirugía radical. La excelencia de nuestros resultados dependen de un estudio preoperatorio meticuloso que permita conocer la extensión de la enfermedad y anticipar tanto el defecto quirúrgico como la resolución de éste, siempre desde el punto de vista de una cirugía mínimamente invasiva.

## SEGUIMIENTO Y PRONÓSTICO

El seguimiento postoperatorio es esencial para el control de la enfermedad y la detección precoz de complicaciones. Puede ser difícil la identificación de segundos tumores primarios o posibles recidivas debido a las secuelas secundarias al tratamiento.

El 80-90% de las recidivas posteriores a un tratamiento con intención curativa ocurren dentro de los primeros 4 años, mientras que la aparición de un segundo tumor primario suele ser más probable a partir de los 3 años. Por esta razón, a pesar de las controversias que existen en la literatura, se recomienda hacer

controles con exploración física cada 1-3 meses durante el primer año, cada 2-6 meses durante el segundo año, semestrales durante el tercer y cuarto años, y más espaciados a partir de los 5 años [32,40]. Si el paciente sigue fumando o presentando factores de riesgo el tiempo de seguimiento debe alargarse.

Los controles, además, deben incluir [32]:

- ✓ Valoración del habla, de la masticación y de la deglución con indicación de rehabilitación si se cree necesario
- ✓ Consejo tabáquico y de alcohol si precisa
- ✓ Prueba de imagen de tórax periódica si el paciente es o fue fumador
- ✓ Valoración de la salud dental, sobretodo en los que han recibido RT
- ✓ Test de hormonas tiroideas cada 6-12 meses en los que han recibido RT cervical

En el seguimiento por técnicas de imagen del cáncer de cabeza y cuello tratado, siempre hay que realizar un estudio basal a las 12 semanas de haber finalizado el tratamiento, que servirá de comparación con estudios posteriores para diferenciar entre recidiva tumoral y cambios secundarios al tratamiento. Éste es el tiempo recomendado para que se resuelvan o disminuyan los cambios inflamatorios y necrohemorrágicos secundarios al tratamiento [41]. El estudio basal es importante en pacientes con riesgo alto o moderado de recidiva y/o en pacientes con gran distorsión de la anatomía por el tratamiento quirúrgico (resecciones amplias, fibrosis, edema, y posibles injertos o colgajos utilizados en la reconstrucción) [42,43]. Se recomienda realizar siempre el mismo estudio para los controles, y a ser posible el mismo que para el diagnóstico, para poder comparar fácilmente los cambios que puedan aparecer.

En caso que la técnica de imagen de control realizada no sea concluyente y haya sospecha de recidiva, la primera opción es realizar una biopsia de la lesión sospechosa. Si la biopsia de ésta es inalcanzable por técnicas habituales, se opta por estudiar la lesión con un PET, pues es la mejor técnica para poder diferenciar una recidiva de cambios secundarios al tratamiento.

# CARCINOMA ESCAMOSO DE OROFARINGE

## PARTICULARIDADES DEL CARCINOMA DE OROFARINGE

La orofaringe se encuentra detrás de la cavidad oral. Está limitada superiormente por el paladar blando e inferiormente por una línea hipotética que cruza horizontalmente la parte superior de la epiglotis. En su parte anterior encontramos el tercio lingual posterior y el istmo de las fauces, y posteriormente las amígdalas faríngeas. La pared lateral está formada por los arcos palatofaríngeos y las amígdalas palatinas.

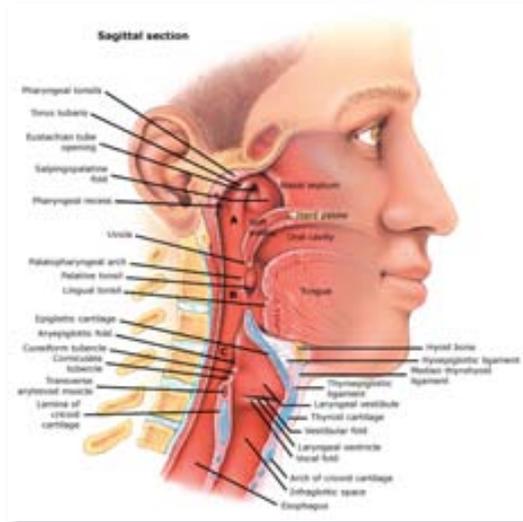


Imagen 31: división anatómica de la faringe

Por tanto, cuando nos referimos a orofaringe hablamos de: superficie inferior del paladar blando, úvula, pilares amigdalinos anteriores y posteriores, surco glosotonsilar, pared faríngea, base de lengua y amígdalas.

En la década de los 90s se observó un aumento de la incidencia de CCE de orofaringe. Así por ejemplo, en los Estados Unidos, entre 1988 y 2004, hubo un incremento del 28% de los CCE de orofaringe [44]. Sin embargo, estos tumores siguen siendo relativamente poco frecuentes, con aproximadamente 123,000 casos de CCE de oro e hipo-faringe diagnosticados y 79,000 muertes a nivel mundial y por año [45]. Actualmente en Estados Unidos la incidencia es de 6.2 cada 100,000 hombres y de 1.4 cada 100,000 mujeres [46].

Se postula que este incremento de incidencia se debe precisamente al CCE de orofaringe relacionado con el VPH, sobre todo del subtipo 16, que tiene especial afinidad por la anatomía de las amígdalas y la base de la lengua [44,47].

Para la clasificación del carcinoma de orofaringe también se utiliza el sistema de estadiaje TNM (tumor, node and metastases) del American Joint Committee on Cancer (AJCC) y la Union Internationale Contre le Cancer (UICC), introduciendo pequeños cambios con relación al estadiaje común de tumores de cavidad oral [31].

### Tumor primario (T)

<b>TX</b>	El tumor primario no se puede definir
<b>T0</b>	No hay evidencia del tumor primario

<b>Tis</b>	Carcinoma in situ		
<b>T1</b>	Tumor $\leq 2$ cm en su mayor dimensión		
<b>T2</b>	Tumor $> 2$ cm pero $\leq 4$ cm en su mayor dimensión		
<b>T3</b>	Tumor $> 4$ cm en su mayor dimensión o con extensión a la superficie lingual de la epiglotis		
<b>T4a</b>	Enfermedad local moderadamente avanzada El tumor invade laringe, musculatura lingual extrínseca, pterigoideo medial, paladar duro o mandíbula*		
<b>T4b</b>	Enfermedad local muy avanzada El tumor invade el músculo pterigoideo lateral, apófisis pterigoides, nasofaringe lateral, base de cráneo o engloba arteria carótida		
<b>Ganglios regionales (N)**</b>			
<b>NX</b>	Los ganglios regionales no se pueden valorar		
<b>N0</b>	No existen metástasis en los ganglios regionales cervicales.		
<b>N1</b>	Metástasis en un ganglio ipsilateral $\leq 3$ cm en su mayor dimensión		
<b>N2</b>	Metástasis en un ganglio ipsilateral $> 3$ cm pero $\leq 6$ en su mayor dimensión, o en múltiples ganglios ipsilaterales $\leq 6$ cm en su mayor dimensión, o en ganglios bilaterales o contralaterales $\leq 6$ cm en su mayor dimensión		
<b>N2a</b>	Metástasis en un ganglio ipsilateral $> 3$ cm pero $\leq 6$ en su mayor dimensión		
<b>N2b</b>	Metástasis en múltiples ganglios ipsilaterales $\leq 6$ cm en su mayor dimensión		
<b>N2c</b>	Metástasis en ganglios bilaterales o contralaterales $\leq 6$ cm en su mayor dimensión		
<b>N3</b>	Metástasis en uno o más ganglios $> 6$ cm en su mayor dimensión		
<b>Metástasis a distancia (M)</b>			
<b>M0</b>	Sin metástasis a distancia		
<b>M1</b>	Metástasis a distancia		
<b>Estadaje /Grupos pronósticos</b>			
<b>Estadío 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Estadío I</b>	T1	N0	M0
<b>Estadío II</b>	T2	N0	M0
	T3	N0	M0
<b>Estadío III</b>	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
	T4a	N0	M0
	T4a	N1	M0
<b>Estadío IVA</b>	T1	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N2	M0
	T4a	N2	M0
<b>Estadío IVB</b>	T4b	Cualquier N	M0
	Cualquier T	N3	M0
<b>Estadío IVC</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1

\* La extensión del tumor primario de base de lengua o valleculea hacia la mucosa de la superficie lingual de la epiglotis no se considera invasión de la laringe.

\*\* Las metástasis al nivel VII son consideradas metástasis regionales.

Tabla 7: Clasificación TNM de los tumores de orofaringe según la AJCC y la UICC

Los tumores de orofaringe tienen baja tendencia a dar metástasis en el nivel cervical I (6-17%), siendo más comunes éstas en el nivel II, seguido de los niveles III y IV. Son raras las metástasis en el nivel V (11%), pero son más frecuentes que en los tumores de la cavidad oral [48,49]. Se considera que las metástasis bilaterales se hallan en aproximadamente el 20% de los casos, siendo éstas más frecuentes en

tumores localizados en la línea media [50]. Además, el porcentaje de metástasis ocultas en los CCE de orofaringe se estima que es del 30-35% [50].

Por esta razón, en el caso de detectar una metástasis cervical de origen desconocido con positividad a CCE VPH+, la primera opción a descartar es el origen amigdalario. En un estudio llevado a cabo por el equipo del Dr Zhang [51] hallaron en el 30% de los pacientes con metástasis cervical de origen desconocido con PAAF positiva a CCE VPH+, un tumor primario de amígdala homolateral y en un 10% de los casos el primario se encontraba en la amígdala contralateral.

## TRATAMIENTO DE LOS TUMORES DE OROFARINGE

En cuanto al tratamiento, debemos destacar que la orofaringe es una localización comprometida, ya que cualquier cirugía fácilmente provocará alteraciones funcionales en el habla, la deglución y la respiración. Al igual que en los tumores de la cavidad oral, los pilares principales del tratamiento de los tumores de orofaringe son la cirugía, la RT y la QT [36,52].

- ✓ Enfermedad de estadiaje precoz, sin afectación ganglionar ⇒ tanto la cirugía como la RT ofrecen tasas equivalentes de curación; por tanto, la opción terapéutica vendrá dada por la valoración de los factores de riesgo así como de las secuelas funcionales para cada localización anatómica. Las tendencias actuales son el tratamiento de los T1-T2 con RT por la menor morbilidad que ésta ofrece, excepto en los tumores de amígdala pequeños donde una simple amigdalectomía nos asegura un buen pronóstico. En los casos con enfermedad residual posterior a la RT, se realiza cirugía de rescate. Igualmente, los pacientes operados y que presentan factores de riesgo como márgenes afectos e invasión perineural o linfovascular, deben recibir RT con o sin QT.
- ✓ Enfermedad de estadiaje avanzado ⇒ hasta la fecha no hay estudios randomizados que comparen cuál es la mejor opción para la preservación del órgano: la cirugía seguida de RT o QT, o la RT-QT. En los casos de íntima vecindad o afectación ósea, se propone la cirugía como primera opción. Para los T4b la cirugía es incapaz de garantizar una resección oncológica y se prefiere la RT y QT concomitante con la posibilidad de un posterior rescate quirúrgico, si el estado general del paciente lo permite.

En cuanto al tratamiento del cuello, existe poca evidencia científica significativa de supervivencia referente a la realización de un VGC electivo o profiláctico [38]. En

pacientes con un ganglio  $\leq 3$  cm en su mayor dimensión, móvil y localizado en la primera escala del drenaje linfático, está indicada la disección radical modificada (funcional) o selectiva [53]. Ante un cuello N2 o N3 está indicado realizar una disección radical cervical o radical modificada. En los casos N2c, la disección radical modificada o selectiva se reserva para el lado menos afecto. La RT adyuvante está recomendada si existen múltiples ganglios o hay presencia de extensión extracapsular.

Algunos factores pronósticos adversos pueden determinar la irresecabilidad cervical, como la invasión cutánea, de la fascia cervical profunda o vertebral, de la arteria carótida, del plexo braquial, de la base del cráneo o intravascular. Las opciones en la invasión de la arteria carótida pueden ser resección de la carótida con o sin reconstrucción, o la reducción del volumen tumoral con terapia adyuvante.

### Tratamiento quirúrgico de los CCE de orofaringe

A menudo los tumores de orofaringe son subestimados, pero en realidad debemos utilizar todas nuestras armas ante un tumor de orofaringe. El abordaje quirúrgico clásico para alcanzar la orofaringe era transmandibular o transhioideo (cortando y atravesando dichas estructuras), lo cual comportaba importantes secuelas estéticas, óseas y dentales. Actualmente existen nuevas técnicas quirúrgicas mínimamente invasivas con resultados equivalentes, como el láser de microcirugía transoral (TLM) o la cirugía robótica transoral (TOR). Por tanto, debemos valorar cuándo utilizar cada técnica.

En caso de precisar cirugía reconstructiva, actualmente, los colgajos libres con técnicas de microcirugía vascular suelen ser los más indicados por su excelente vascularización, buena adaptación a los complicados defectos tisulares de la orofaringe y por usar zonas dadoras de escasa o nula repercusión estética. Las paredes faríngeas posteriores y laterales pueden ser reconstruidas con injertos de piel libres, loco-regionales o colgajos microvascularizados. Por otra parte, defectos importantes en áreas como la base de la lengua y región amigdalina precisan de colgajos de mayor espesor como son los miocutáneos de pectoral mayor, microvascularizados como el recto de abdomen, dorsal ancho, o colgajos osteomiocutáneos. Los colgajos miocutáneos pediculados se usan generalmente para reconstruir defectos parciales de la circunferencia de la faringe, mientras que para reconstruir los defectos totales se usan colgajos microvascularizados de yeyuno o con una gastroplastia.

## Quimioterapia

La QT de inducción se utiliza con la intención de mejorar la tasa de supervivencia y reducir la morbilidad funcional de una cirugía muy agresiva [54]. También es una opción de tratamiento en la enfermedad irresecable, pero queda por establecer su papel en la enfermedad resecable. Actualmente, cisplatino y carboplatino en monoterapia son los fármacos de elección para combinar con RT, siendo la neoadyuvancia de cisplatino y 5-fluorouracilo los más útiles en QT de inducción [55]. La suma de docetaxel al cisplatino y al 5-fluorouracilo incrementa aún más la supervivencia, según algunos estudios [56].

En un estudio que incluía numerosos pacientes con CCE de orofaringe se obtuvieron mejores resultados de supervivencia en los pacientes tratados con RT y cetuximab<sup>12</sup> frente a los tratados solamente con RT [57]. Pero actualmente no hay ningún estudio comparativo entre el cetuximab y otros citostáticos derivados del platino.

Por otra parte, varios trabajos coinciden en señalar que la única combinación de QT que incrementa la supervivencia respecto a un tratamiento local exclusivo es la combinación de RT y QT concomitante. El tratamiento con QT y RT concomitante es un tratamiento estándar en el cáncer de orofaringe localmente avanzado e irresecable, y una opción de tratamiento en los estadios III y IVM0, aunque conlleva un incremento asociado de toxicidad. La QT adyuvante debe tenerse en cuenta en pacientes operados con factores de mal pronóstico.

## Radioterapia

La RT en el cáncer de orofaringe puede utilizarse con finalidad radical en los estadios I y II [58]. El tratamiento con cirugía y RT postoperatoria en los estadios III y IV se considera el tratamiento estándar, porque disminuye el riesgo de recidiva loco-regional [59]. Con el tratamiento de cirugía y RT, un 30% de los pacientes presenta recidiva loco-regional y la supervivencia se sitúa alrededor del 40% a los 5 años [60]. La combinación de QT simultánea y RT ha conseguido mejorar los resultados (control local y supervivencia) en los tumores localmente avanzados y en los tumores operados con factores de mal pronóstico.

El tratamiento con RT suele ser diario y a dosis fraccionadas. Como regla general debe incluirse toda la orofaringe en el volumen de irradiación. El mejor control ganglionar se consigue con la inclusión de todas las áreas ganglionares. Hay algunas excepciones a esta recomendación general; por ejemplo, no es necesaria la irradiación del cuello contralateral en un N0 de lesiones lateralizadas o incluir los

---

<sup>12</sup> El cetuximab es un anticuerpo monoclonal recombinante que inhibe competitivamente los ligandos naturales del receptor del factor de crecimiento epidérmico.

submentonianos cuando los subdigástricos y submaxilares son negativos, así como tampoco los niveles ganglionares bajos (IV y V).

## PRONÓSTICO DEL CCE DE OROFARINGE

Las estadísticas entre los años 1988 y 2004 reportan una supervivencia a los 5 años para todos los tumores de orofaringe y para los loco-regionalmente avanzados del 53% y del 40%, respectivamente. Sin embargo, los registros actuales sugieren una mejora de la supervivencia en los últimos años [61], probablemente relacionado con el incremento de tumores secundarios a la infección por VPH. Y así es, múltiples publicaciones reflejan que los tumores de orofaringe relacionados con el VPH tienen mejor pronóstico que aquellos no relacionados con el mismo. En ensayos de pacientes con enfermedad avanzada y VPH+ se han observado tasas de supervivencia de hasta el 80% a los 5 años [62-64].

# VIRUS PAPILOMA HUMANO

## VIROLOGÍA DEL VPH

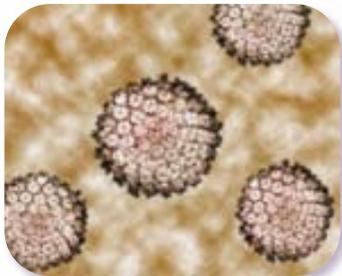


Imagen 32: estructura del VPH

El VPH es miembro de la familia *Papillomavirus*, y junto a la familia de virus *Polyomavirus*, forman la especie *Papovaviridae*. Se trata de pequeños virus extensamente distribuidos entre los vertebrados. De hecho, actualmente la infección por VPH encabeza las enfermedades de transmisión sexual en Estados Unidos [65].

El virión del VPH está formado por una doble cadena de ADN<sup>13</sup> circular de aproximadamente 7'9 Kb y protegido por una pequeña cápsula. Esta protección, que consiste en dos proteínas estructurales, mide unos 55nm de diámetro.

El genoma del VPH comprende genes tempranos (E<sup>14</sup>) y tardíos (L<sup>15</sup>), que codifican respectivamente proteínas tempranas (E1-E7) y tardías (L1-L2). Las tempranas, que se expresan al inicio de la infección, son proteínas no estructurales involucradas en la replicación y transcripción del genoma viral (E1-E5) y la transformación tumoral de las células huésped (E6-E7). En cuanto a las tardías, L1 y L2, se activan en las fases finales del ciclo viral y son proteínas estructurales de la cápsula del virión [66-68].

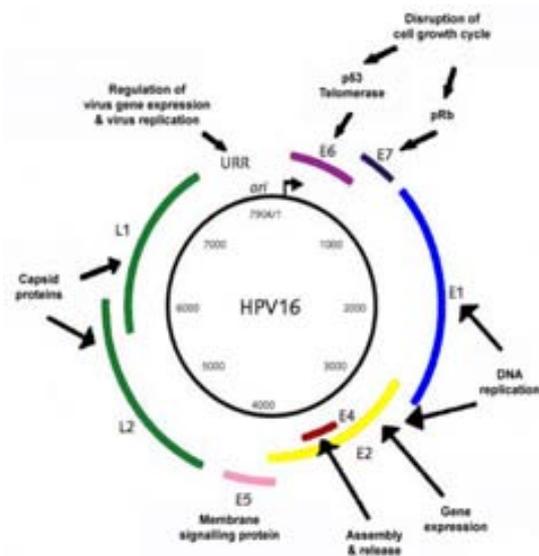


Imagen 33: gráfico esquemático de las proteínas que forman el VPH

PROTEINA	FUNCION
<b>Tempranas (E)</b>	
<b>E1</b>	Inicia la replicación del genoma viral

<sup>13</sup> ADN =Ácido Desoxirribo-Nucleico  
<sup>14</sup> E= early  
<sup>15</sup> L= late

<b>E2</b>	Replicación y transcripción del ADN viral. Segregación genoma viral
<b>E4</b>	Encapsulación genoma viral. Maduración de las partículas virales
<b>E5</b>	Oncoproteína. Participa en la transformación de la célula huésped y bloquea la apoptosis en fases tardías de la carcinocénesis
<b>E6</b>	Oncoproteína mayor. Inactiva p53. Bloquea la apoptosis. Interactúa con proteínas de la célula huésped con dominios PDZ
<b>E7</b>	Oncoproteína mayor. Inactiva pRb. Promueve la síntesis y proliferación del ADN huésped. Interactúa con varias células huésped
<b>Tardías (T)</b>	
<b>L1</b>	Proteína de la cápside mayor
<b>L2</b>	Proteína de la cápside menor

Tabla 8: cuadro resumen de las proteínas del VPH y sus funciones respectivas

## CLASIFICACIÓN

Los genomas de varios tipos de VPH han sido aislados, secuenciados y comparados con los prototipos de referencia cantidad de veces y en distintos laboratorios a nivel mundial. A raíz de dichos análisis, se ha demostrado que cada tipo de VPH se presenta en forma de una “variante” distinta, identificando aproximadamente un 2% de diferencias en los nucleótidos en la mayoría de los genes y un 5% en las regiones menos conservadas. Casi 100 variantes de cada tipo de VPH han sido detectadas. Además, cada población inmigrante contiene combinaciones de estas variantes, dependiendo de su respectivo origen étnico [69]. Actualmente más de 100 tipos de VPH son conocidos [70-72]. Los exámenes moleculares sugieren que las variantes del mismo tipo de VPH son biológicamente distintas y por esta razón pueden conferir diferente riesgo patogénico.

De acuerdo con su potencial oncogénico, el VPH se puede clasificar como de “alto” y de “bajo” riesgo [70,73-76]. Ambos tipos de VPH pueden inducir el crecimiento celular anormal, pero solamente los de alto riesgo pueden producir malignización del tejido infectado, ya que únicamente la proteína E-7 codificada por los VPH de alto riesgo es capaz de immortalizar las células epiteliales humanas [67,75,76].

Los tipos de VPH considerados de alto riesgo son los siguientes: 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 66, 68 y 73 [70,73,74,76].



Imagen 34: lesión verrugosa producida por VPH de bajo grado



Imagen 35: lesión maligna relacionada con VPH de alto grado

## MECANISMO ONCOGÉNICO DEL VPH

Basándose en la evidencia epidemiológica y molecular, en 1995 la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (*International Agency for Research on Cancer*) demostró que los tipos de VPH 16 y 18 son carcinógenos humanos, por lo que fueron clasificados dentro del grupo de alto riesgo oncogénico [77].

La mayoría de carcinomas relacionados con el VPH contienen ADN de VPH integrado en el genoma de las células huésped y expresan dos genes virales, E6 y E7, ambos codificadores de oncoproteínas.

A través del simple contacto, heridas o abrasiones muco-cutáneas, el VPH infecta las células basales del epitelio, que son las únicas con capacidad de división. A partir de aquí, la historia natural oncológica del VPH se divide en 4 estadios:



Tras iniciar la infección de las células de la capa basal del epitelio, el ADN viral afecta los diferentes estratos epiteliales. Los genes virales se expresan de forma secuencial, siendo los primeros en expresarse los genes E y luego los L, de tal manera que se ha observado que la maduración viral está íntimamente relacionada con el grado de diferenciación epitelial. Así, la expresión de antígenos virales tempranos (E) se encuentra en las células del estrato basal, mientras que los antígenos virales tardíos (L) se forman en el estrato epitelial superficial queratinizado.

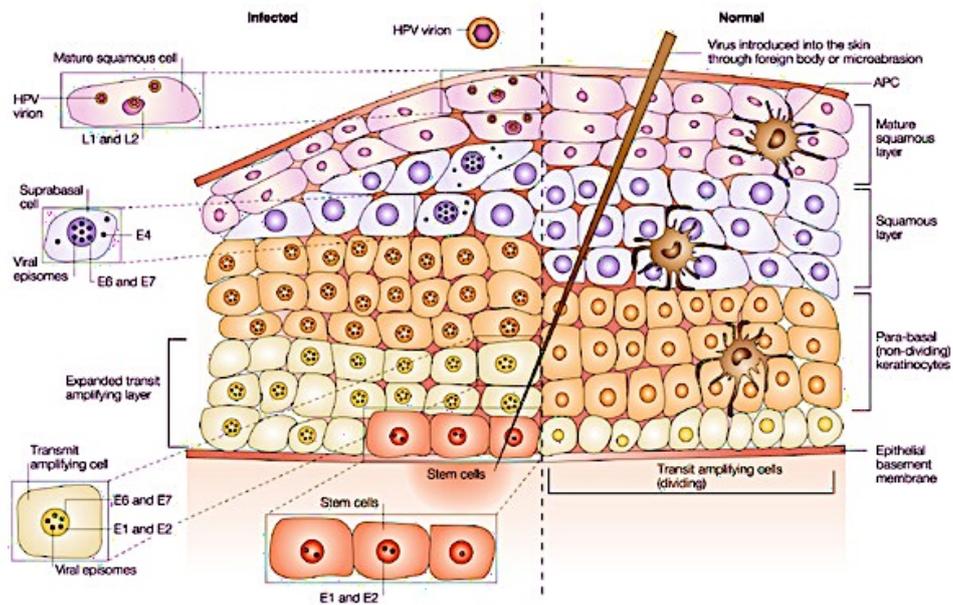


Imagen 36: esquema comparativo de tejido humano incapaz de controlar la infección por el VPH con tejido humano capaz de controlar la infección por el VPH

La pérdida de control de la apoptosis y del ciclo celular constituye un evento temprano en las carcinogénesis mediadas por VPH y se cree que la integración del VPH en el genoma de la célula huésped es el punto clave. Sin embargo, estudios recientes sugieren que la transcripción del ARNm de E6 y E7 del VPH 16 en el carcinoma de amígdala no es necesariamente dependiente de la integración del ADN viral al de la célula infectada, pues éste puede encontrarse predominantemente de forma episomal y formar parte igualmente del proceso carcinogénico [78].

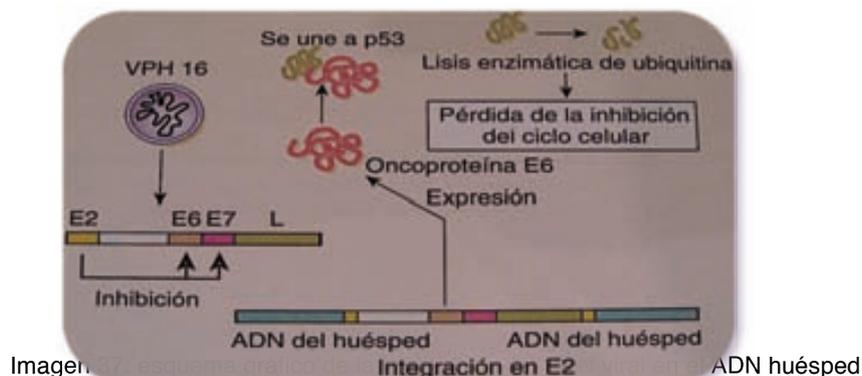
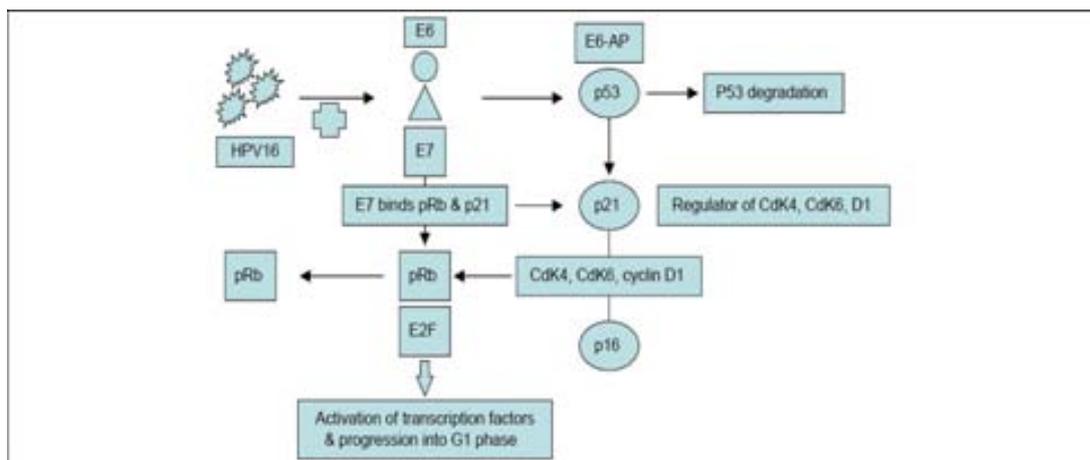


Imagen 37: esquema de la vía de señalización de p53 y su inhibición por E6

En las células infectadas, la proteína E6 del VPH de alto riesgo liga e induce la degradación del supresor tumoral p53. Además, la E6 inactiva la telomerasa, una enzima que mantiene la estabilidad telomérica del ADN. Esto conlleva gran inestabilidad celular y disfunción de la apoptosis celular.

Por otro lado, la proteína E7 juega un papel crucial en el ciclo vital del VPH, inhibiendo la proteína retinoblástica (pRB)<sup>16</sup> y otras proteínas relacionadas, con lo que se liberan factores de transcripción que activan algunos genes que regulan el ciclo celular y se favorece la proliferación celular. Esto se traduce en una sobreproducción de p16, y contrariamente ésta en condiciones normales se une al complejo ciclina D1 para evitar la fosforilación de la pRB [65-68,74-76]. A causa de estas cadenas de inhibición, en estas neoplasias VPH+ se encuentran distintas expresiones moleculares que en las negativas para VPH [79-84].

- ✓ VPH+: inhibición de p53, pRB y ciclina D1. Sobreexpresión de p16
- ✓ VPH-: sobreexpresión de p53, pRB y ciclina D1. Inhibición de p16



Determinados estudios han evidenciado que del mismo modo que las proteínas E6-E7 tienen la capacidad de inhibir los supresores tumorales p53 y pRB, si reprimimos las proteínas E6-E7, los supresores tumorales reanudan su función normal e inician la apoptosis de las células dañadas [67]. En conclusión, las proteínas E6 y E7 son las responsables de immortalizar la actividad celular, pero no queda claro el porqué de la transformación maligna. Existen un par de hipótesis acerca la progresión celular hasta el fenotipo maligno:

- ✓ La inestabilidad cromosómica que caracteriza la infección por el VPH
- ✓ La interferencia del VPH en la cascada de señales intercelulares mediada por citoquinas, la cual juega un papel importante en la inhibición de la transformación maligna

<sup>16</sup> La pRB inhibe la regulación positiva del crecimiento celular e induce la apoptosis celular en respuesta a la agresión del ADN celular.

Además, la variabilidad de cada tipo de VPH comporta también distintos grados de afectación celular. En el caso del VPH 6, considerado de bajo riesgo, la proteína E7 se une a las pRB con menos afinidad que en el caso del VPH 16, por lo que no es capaz de inmortalizar el ciclo celular [81,85].

Se estima que se precisan un mínimo de 10-15 años de infección por VPH para producir cancerización en el tejido infectado [86,87].

Para finalizar, destacar que el hecho de que la infección por el VPH produzca inestabilidad genómica, no significa que degenera necesariamente en un proceso maligno. Sin embargo, los serotipos de VPH de alto riesgo se detectan 3 veces más en lesiones malignas que en las benignas o precancerosas [82,88].

## EPIDEMIOLOGÍA

El VPH es la infección transmitida por vía sexual más frecuente en la actualidad. Se postula que alrededor del 80% de los jóvenes sexualmente activos en algún momento de su vida tendrán o han estado en contacto con el VPH, aunque en la mayoría de los casos sea de forma asintomática y temporal [65].

En un estudio epidemiológico realizado a nivel mundial en 2007 por el equipo de Sanjosé et al. [89], en el sexo femenino se demostró una prevalencia de VPH en cuello de útero del 10%. La mayor prevalencia regional se halló en África, donde se evidenció infección cervical por VPH en el 22% de las mujeres. Los tipos de VPH 16 y 18 fueron los más destacados. Parece ser que la prevalencia disminuye en las mujeres a partir de los 30 años, y en aquellas en las que persiste la infección suelen hallarse en riesgo de desarrollar lesiones cancerosas.

En España las estadísticas indican que la prevalencia global de infección por tipos oncogénicos de VPH es de un 14.3% en el grupo de 18-65 años de edad, y que entre los 18 y 25 años de edad es del 29%.

La prevalencia de VPH en los genitales masculinos se ha relacionado con la raza, etnia, coinfección del VIH, comportamiento sexual, número de compañeros sexuales, uso de preservativo, antecedentes de enfermedades de transmisión sexual y estado de circuncisión. En un estudio de Chin-Hong [90], uno de los más relevantes, la prevalencia de VPH en genitales de hombres homosexuales, con o sin relaciones heterosexuales, fue del 53%, y al menos una tercera parte de los voluntarios presentaban subtipos de VPH de riesgo oncogénico. Los factores asociados a infección de alto riesgo oncogénico fueron el tabaco, consumo abusivo de alcohol y elevado número de compañeras sexuales. Paralelamente, el uso de preservativo se asoció con menor probabilidad de infección por VPH. Otro estudio

demonstró que la infección por VPH en hombres tardaba en general 7'5 meses en desaparecer y específicamente el VPH 16 no desaparecía hasta transcurrido un año [91]. Los estudios en hombres que practican sexo con hombres son abundantes, concluyéndose que la prevalencia de VPH anal en hombres homosexuales de Estados Unidos está alrededor del 57% y que la coinfección con VIH produce mayor prevalencia de VPH de alto riesgo y presencia de mayor variabilidad de subtipos de VPH [90,92].

A pesar de la discrepancia de prevalencias de infección (hombres>mujeres) , la baja probabilidad de aclarado de la infección en las mujeres a nivel de cuello de útero provoca que en éstas el VPH persista y que las tumoraciones relacionadas con el VPH representen más del 50% de tumores relacionados con infecciones. En cambio, en el sexo masculino apenas llegan a representar el 5% [70,93]. También es importante destacar que la inmensa mayoría de infecciones por VPH de alto riesgo regresan por sí solas sin causar tumoraciones malignas [94]. Tanto es así que, generalmente, el individuo que es la fuente de transmisión desconoce su estado de infección, ya que suele tratarse de un proceso asintomático.

En cuanto a su presencia en la cavidad oral, Gillison et al. [95] estudiaron la prevalencia de VPH en células exfoliadas orales en la población estadounidense, tanto femenina como masculina. La prevalencia global de ADN del VPH en células exfoliadas orales fue del 6.9%, y la prevalencia de VPH 16 fue del 1%. La prevalencia de infección por el VPH sigue una distribución biomodal, con picos en las edades de 30 a 34 y de 60 a 64 años (7,3% y 11,4% respectivamente), probablemente relacionado con la posibilidad de un estado latente del VPH entre estos períodos y su reactivación cuando el sistema inmune del huésped se deprime con el envejecimiento [96,97]. La prevalencia del VPH fue aproximadamente tres veces más común en hombres que en mujeres (10,1% frente al 3,6%), como ocurre en el cáncer de orofaringe asociado al VPH [95].

En pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida la presencia de múltiple tipos de VPH de alto riesgo es común, asociada a la inmunosupresión secundaria a la infección por el VIH. De forma bidireccional, los pacientes portadores de VPH adquieren más fácilmente el VIH que aquellos no infectados [90,92,98].

## FACTORES DE RIESGO DE TRANSMISIÓN

Está suficientemente demostrado que para la transmisión de las verrugas víricas cutáneas es esencial el contacto



íntimo interpersonal. A nivel ano-genital, estudios epidemiológicos del carcinoma cervical uterino han demostrado claramente que los tipos de VPH de alto riesgo son transmitidos por contacto sexual [77,99,100].

Pero es importante destacar que con el simple contacto sexual puede transmitirse el VPH, y no es imprescindible la penetración, aunque con ésta última sea más probable la infección. Igualmente, se postula que el contacto digital/anal o digital/vaginal puede también diseminar la infección viral [101]. El riesgo de infección por VPH es directamente proporcional al número de compañeros sexuales distintos [99,100]. La transmisión tanto en hombres como en mujeres suele ser, como hemos dicho, asintomática.

En cuanto a la infección de VPH oral, ésta es infrecuente en adolescentes que no se han iniciado en relaciones sexuales. En cambio, el número de infecciones aumentan cuando la persona es sexualmente activa, por lo que consideramos que la actividad sexual es el factor de transmisión más consistente.

Varios estudios caso-control han reportado que ciertos tipos de conducta sexual incrementan el riesgo de CECC VPH+. En ambos sexos el riesgo se ve incrementado con el número de compañeros sexuales y la práctica activa de sexo oral u oro-anal [99-103]. La probabilidad de contagio directo del boca-boca con besos profundos “con lengua” es más dudosa, pero no se descarta [95,102,103]. En el sexo masculino se incluye además la edad de la primera relación sexual y la posible historia de verrugas genitales [90].

El riesgo de contraer el VPH a nivel oral se incrementa en pacientes con historia de carcinoma ano-genital VPH+ [93]. Además, algunos estudios han sugerido que los esposos de las mujeres con cáncer de cuello de útero tienen 2-3 veces más riesgo de padecer un CCE de orofaringe VPH+, hallazgo que potencia la hipótesis de la transmisión oro-genital [104].

El aislamiento de VPH en verrugas ano-genitales y en infecciones de la mucosa de la vía aérea superior en niños, ha postulado la transmisión del virus por madres infectadas a sus hijos recién nacidos a través del canal del parto. Por esta razón, algunos defienden la vacunación de estas pre-mamás como mecanismo preventivo [105,106].

Se asume que la infección del VPH precede al desarrollo del CECC con positividad a VPH: la presencia de infección por VPH de alto riesgo en la mucosa oro-faríngea y su seropositividad incrementan significativamente el riesgo de desarrollar CECC. Asimismo, los factores de riesgo para contraer la infección oral del VPH son probablemente, por extensión, los mismos factores de riesgo que para el CECC VPH+.

## OTROS FACTORES DE RIESGO

Aunque la literatura evidencia que el VPH+ se asocia al CECC en no fumadores ni bebedores, no se conoce todavía el grado en que el riesgo carcinógeno de la infección por VPH puede combinarse con el riesgo carcinógeno del tabaco y del alcohol. Existen datos controvertidos, sugiriéndose una acción concurrente, una acción sinérgica o un efecto adicional [82,107].

En algunos estudios se ha hallado una relación significativa con el consumo de marihuana y con una escasa higiene oral, aunque ambos factores son bastante controvertidos [82].

Recientemente también se ha evidenciado el aumento de incidencia de VPH+ en pacientes VIH+, así como que las enfermedades relacionadas con VPH aumentan en la cavidad oral de los pacientes VIH+ y, además, que éstas no mejoran con el tratamiento antirretroviral [90,92,98].

Los individuos con susceptibilidad genética, como por ejemplo los pacientes con anemia de Fanconi, también son más propensos a la cancerización en presencia del VPH orofaríngeo [108].

## PRESENTACIÓN CLÍNICA DEL VPH

El VPH es un virus que por su tropismo tisular puede clasificarse como epiteliotropo o mucotrópico. En la mayoría de los casos la infección produce una proliferación tisular benigna, al igual que en la mayoría de los casos la infección se elimina en 6-12 meses [91,94]. Sin embargo, sin conocerse todavía el porqué, algunas infecciones de ciertos tipos virales pueden conducir a una transformación epitelial maligna en determinados sujetos.

Ciertos tipos de VPH tienen predilección por el tejido cutáneo y los encontramos, entre otros, en la verrugas plantares (VPH 1 y 2), verrugas comunes (VPH 2 y 4), verrugas planas (VPH 3 y 10) y verrugas del carnicero (VPH 2 y 7) [109].

La enfermedad de Bowen, una forma de CCE *in situ*, se presenta tanto de forma genital como extragenital. Puede dar clínica en los dedos, en las palmas, en los pies y en la mucosa genital. Varios tipos de VPH se han aislado en estos pacientes: 2, 3, 4, 16, 18, 31, 32, 34 y otros [109].

Enfermedad	Tipo de VPH más frecuentemente asociado
Ectodermis Epidermis	
Epidermis	
	

Imagen 39: proliferación tisular secundaria a la infección por VPH

La epidermodisplasia verruciforme es una condición probablemente autosómica recesiva muy infrecuente, que se caracteriza por la aparición en la infancia de lesiones similares a la verrugas producidas por el VPH. En aproximadamente la mitad de los pacientes existe transformación maligna cuando son adultos. Se han aislado varios tipos de VPH en estas lesiones, pero los que se consideran que tienen más potencial maligno son los VPH 5 y 8 [110].

La papilomatosis respiratoria recurrente es el tumor laríngeo benigno más común en la infancia, y se cree que es producida por el VPH adquirido durante el paso del recién nacido por el canal del parto en madres infectadas [105,106]. Los tipos VPH 6 y 11 son los más habitualmente relacionados. A pesar de tratarse de una proliferación benigna, pueden surgir problemas secundarios a la obstrucción de la laringe y a la proliferación de las verrugas a nivel pulmonar.

También existen tipos de VPH con predilección por las mucosas ano-genitales, manifestándose en forma de verrugas genitales o venéreas (*condiloma acuminatum*) o de condilomas gigantes (tumores de Buschke-Loewenstein) (mayormente causados por los VPH 6 y 11), enfermedad de Bowen y pápulas bowenoides (ambas relacionadas con el VPH 16), carcinomas o neoplasias intraepiteliales ano-genitales (relacionados con el VPH 16 y 18) [111].

Verruga plantar	1, 2
Verruga común	2, 4
Verruga plana	3, 10
Verruga del carnicero	7, 2
Enfermedad de Bowen	
• Genital	16, 18, 31, 32, 34
• Extragenital	2, 3, 4, 16
Epidermodisplasia verruciforme	2, 3, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17
Condiloma acuminado	6, 11
Papulosis Bowenoide	16, 34, 37, 42
Papilomatosis intraepitelial	
• Bajo grado	6, 11
• Alto grado	16, 18
Papilomatosis respiratoria	6, 11
Tabla 9: relación de VPH- patología	

La mayoría de las infecciones por VPH quedan resueltas en 6-12 meses, pero a pesar de los numerosos estudios llevados a cabo hasta la fecha, no sabemos por qué razón algunas de éstas persisten en ciertos individuos pasado este período. Existe evidencia de que el VPH puede pasar a un estado latente [96,97], y también que puede haber una reactivación viral en mujeres VIH+ y en algunas de edad avanzada [95,97]. Tampoco ha quedado resuelto por qué algunas infecciones malignizan y otras no. Por otra parte, se ha sugerido que los pacientes con un tumor relacionado con el VPH tienen más riesgo de tener otro tumor relacionado con el VPH en otra localización distinta que el resto de la población [112]. Estas interesantes incógnitas, junto al tiempo de latencia entre neoplasias, se encuentran aún en fase de estudio.

El cuello de útero es la 3ª localización más frecuente a nivel mundial de cáncer en la mujer con una incidencia estimada de 530,000 casos en 2008. La relación del carcinoma cervical uterino con la infección del VPH está ampliamente aceptada, considerándose que la causa del 100% de estas neoplasias se atribuye al VPH [113]. En realidad, las dos variantes VPH 16 y VPH 18 son causantes de entre el 70% y 90% de los carcinomas cervicales uterinos, siendo el VPH 16 el responsable de al menos el 60% de los casos [113].

Paralelamente, los tipos de VPH de alto riesgo se han asociado, aunque con menos fuerza, a otros carcinomas ano-genitales (vulvar, vaginal, anal y peneano) e incluso a algunos CECC [93,95]. Los tumores vulvares y vaginales son globalmente poco frecuentes, con una incidencia estimada de 27,000 y 13,000 casos respectivamente en 2008 [113]. Los VPH 16 y 18 se asocian con el 60% de las lesiones precancerosas y cancerosas vaginales VPH+, el 35% de los cánceres vulvares VPH+ y el 75% de las lesiones precancerosas vulvares [114].

El cáncer anal es globalmente poco frecuente, con una incidencia estimada de 27,000 casos en 2008, pudiéndose atribuir el 88% de los casos al VPH [113], y específicamente el 70% de lesiones precancerosas y cancerosas a los subtipos 16 y 18 [115]. Los estudios epidemiológicos reflejan un aumento de incidencia de cáncer anal, sobre todo en los hombres que practican sexo anal y en los VIH+.

En 2008 se estimó la incidencia de neoplasias de pene en 22,000 casos, atribuyéndose el 50% al VPH [113]. Los subtipos 16 y 18 causan aproximadamente el 35-40% de los tumores peneanos y el 70-80% de los casos VPH+ [116].

Dentro de los CECC, en orofaringe es donde asientan más frecuentemente los tumores VPH+, con una asociación de hasta el 50-80% dependiendo del país y del estudio [72,95,107,117].

Nuevos trabajos han relacionado las neoplasias de laringe con la infección por VPH. Así por ejemplo, un metanálisis que incluye 55 estudios con un total de 2,559 pacientes con cáncer de laringe obtuvo una prevalencia del 28% de casos VPH+

[118]. El genotipo más relacionado con el CECC también fue el VPH 16, seguido del 18 [95,117,118].

## TÉCNICAS DE DETECCIÓN DEL VPH

### Diagnóstico anatomopatológico

El diagnóstico anatomopatológico de CCE VPH+ puede realizarse mediante una biopsia o una citología. A partir de nuestra muestra, podemos detectar el VPH por:

- ✓ Características histológicas sugestivas de infección viral con tinción hematoxilina-eosina
- ✓ J~~□□□□□□~~ sobreexpresión de p16 nuclear y/o citoplasmática mediante técnicas inmunohistoquímicas [118,119]
- ✓ ADN del VPH: detección del ADN mediante PCR<sup>17</sup> y/o hibridación *in situ* [119,120]
- ✓ ARN del VPH: expresión del ARN de las proteínas E6 y/o E7 y detección mediante PCR y/o hibridación *in situ* [121]

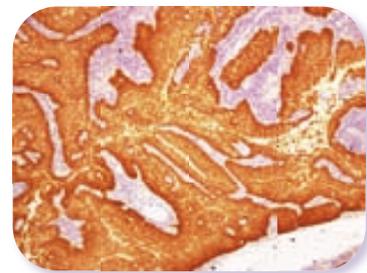


Imagen 40: corte histológico: detección inmunohistoquímica de la sobreexpresión de p16

### Obtención de muestras

El diagnóstico histológico de CCE puede realizarse mediante biopsia o PAAF, y además esta muestra puede obtenerse de una lesión primaria o de una lesión secundaria, ya sean metástasis ganglionares o a distancia. La biopsia nos permite analizar extensamente tanto la celularidad como la estructura histológica del tejido. En cambio, cuando el diagnóstico se basa en una PAAF, el estudio de la estructura histológica queda limitado. Por otro lado, tanto la tinción de p16 como la detección del ADN viral mediante PCR/ hibridación *in situ* pueden llevarse a cabo de forma apropiada con las muestras de la PAAF.

Como hemos comentado anteriormente, en caso de detectar una metástasis cervical con tumor primario de origen desconocido con positividad a CCE VPH+, la primera opción a descartar es el origen amigdalario [47].

Las metástasis cervicales VPH+ han sido identificadas no solamente por la detección de VPH y la inmunoreactividad de p16, sino que además se han

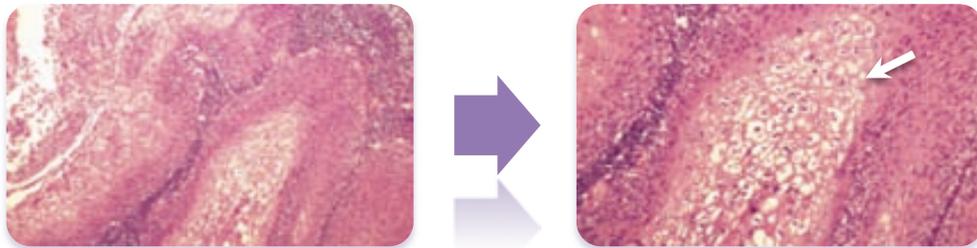
<sup>17</sup> PCR= Polymerase Chain Reaction = Reacción en Cadena de la Polimerasa

correlacionado con una morfología histológica no queratinizante determinada: carcinoma escamoso tipo basaloide.

### Características citológicas

El procesado de la biopsia mediante inclusión con parafina, fijación en formol y tinción con hematoxilina-eosina, nos permite determinar el tipo histológico y si existen cambios citopáticos sugestivos de infección vírica.

- ✓ Estas lesiones presentan las características morfológicas de los CCE, aunque suelen presentar poca diferenciación con escasa queratinización y características basaloides
- ✓ Se observan núcleos irregulares con binucleaciones y coilocitos<sup>18</sup>
- ✓ Existe infiltración de linfocitos en el estroma y en los nidos tumorales



Imágenes 41 y 42: características histológicas sugestivas de VPH+: coilocitos y binucleación

### Tinción inmunohistoquímica p16

La expresión del p16 parece ser un marcador de la integración del material genético del VPH en el ADN de la célula huésped. La sobreexpresión de p16 se cree que está relacionada con el buen pronóstico de la enfermedad, aunque no pueda demostrarse siempre su correlación con el VPH.

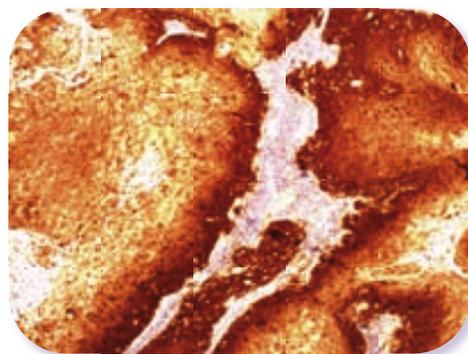


Imagen 43: tinción inmunohistoquímica de p16

<sup>18</sup> Coilocito: célula epitelial escamosa altamente sugestiva de infección vírica, y sobre todo del VPH. Presenta cambios típicos tanto en el núcleo como en el citoplasma: la forma es ovoide, con una condensación periférica del citoplasma dándole un aspecto en "asa de alambre" y el núcleo se localiza de manera exéntrica, lo que lo convierte en un halo perinuclear.

Esta técnica inmunohistoquímica pretende detectar cualitativamente el antígeno p16 basándose en el anticuerpo clon E6H4<sup>TM</sup> específicamente diseñado como el método para la identificación de la p16 en muestras histológicas. Siguiendo un protocolo inmunohistoquímico de dos pasos, la sobreexpresión de p16 se visualiza en el preparado tisular como un precipitado de color marrón.

## DetECCIÓN DEL ADN VIRAL POR PCR

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés de *Polymerase Chain Reaction*, es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis.

El objetivo de la PCR es, a partir de un fragmento de ADN particular, obtener un gran número de copias de dicho fragmento, es decir, amplificarlo. En teoría basta con una única copia de ese fragmento original o molde. La utilidad de esta técnica se centra en que, tras la amplificación del molde de ADN, resulta mucho más fácil y probable identificar estructuras moleculares de virus, bacterias, incluso de personas o cadáveres. Por regla general, la PCR es una técnica común y normalmente indispensable en los laboratorios de investigación médica y biológica con una gran variedad de aplicaciones. Entre ellas se incluyen la clonación de ADN para la secuenciación, la filogenia basada en ADN, el análisis funcional de genes, el diagnóstico de trastornos hereditarios, la identificación de huellas genéticas (usada en técnicas forenses y estudios de paternidad) y la detección y diagnóstico de enfermedades infecciosas, como es el caso que nos implica: la detección del ADN del VPH. Estos usos tan variados de la amplificación, han hecho que se convierta en una técnica muy extendida, con el consiguiente abaratamiento del equipo necesario para llevarla a cabo.



Imagen 44: Termociclador: aparato en el que se efectúa la PCR convencional.

Esta técnica se fundamenta en la propiedad natural de replicar hebras de ADN de las ADN polimerasas, enzimas extraídas de microorganismos con propiedades

termoestables como: *Thermus aquaticus* (polimerasa Taq), *Pyrococcus furiosus* (Pfu), *Thermococcus litoralis* (Vent) y *Thermus thermophilus* (Tth). Generalmente se emplean mezclas de polimerasas muy procesivas (Taq) con otras capaces de hacer corrección de errores (Pfu, Vent).

Para conseguir que la ADN polimerasa replique el ADN se emplean ciclos de altas y bajas temperaturas alternados para separar las hebras de ADN recién formadas entre sí tras cada fase de replicación y, a continuación, se dejan que vuelvan a unirse las hebras de ADN para que se dupliquen de nuevo. Actualmente todo el proceso de la PCR está automatizado mediante un aparato llamado termociclador, que permite calentar y enfriar los tubos de reacción para controlar la temperatura necesaria para cada etapa de la reacción en cadena.

### **Hibridación *in situ***

La técnica de hibridación *in situ* está basada en la capacidad que poseen los ácidos nucleicos para hibridarse entre sí (unirse con la cadena complementaria). Es decir, determinada secuencia de ADN o ARN, siempre tiene su secuencia complementaria.

Su utilidad reside en la capacidad de demostrar, mediante la utilización de una sonda (formada por una secuencia de ADN previamente conocida) marcada con un isótopo radiactivo, la presencia de determinada secuencia de ADN o ARN complementaria en la muestra a estudiar.

Lo que se produce mediante la utilización de esta técnica es la hibridación (unión), de la sonda marcada, con la secuencia a buscar (en el caso de estar presente en la muestra) y posteriormente mediante técnicas específicas (autoradiografía o inmunohistoquímica), se transforma la secuencia en algo visible para el ojo humano. En general, la hibridación puede hacerse sobre soportes sólidos (filtros de nylon o nitrocelulosa), en solución (*in vitro*) o en cortes de tejido o preparaciones celulares (*in situ*).

En la técnica de PCR-hibridación *in situ* se realiza primero la amplificación del ADN mediante PCR y después su detección mediante hibridación *in situ* convencional con sondas ADN/ARN. De esta manera pueden detectarse cantidades pequeñísimas de genoma viral.

### **Correlación PCR-hibridación *in situ* y p16**

Actualmente, las técnicas aprobadas por la FDA<sup>19</sup> son las de detección del ADN del VPH, pero se considera que la detección del ARN de las proteínas E6 y/o E7 es más específica y que, incluso, la detección de p16 presenta más relación con el pronóstico de la enfermedad tumoral, que es clínicamente el punto más relevante [119].

La correlación del pronóstico tumoral con la tinción de p16 es más intensa que con la detección del ADN del VPH, pues se ha demostrado que los tumores VPH+ con baja expresión de p16 tienen peor pronóstico que los VPH+ con alta expresión de p16 [122]. Es más, algunos autores sólo aceptan como tumores asociados al VPH aquellos con alta expresión de p16 y positivos con hibridación *in situ*, ya que han demostrado que sólo estos pacientes tienen mejor pronóstico al tratamiento [123,124].

Por esta razón, el mecanismo de detección del VPH en los pacientes con CECC probablemente cambiará a medida que avancen las investigaciones.

**La positividad del VPH en la PCR nos indica la presencia de la infección vírica, aunque no nos asegura que el tumor sea secundario a la infección, ya que pueden coexistir otros factores de riesgo, como el tabaco o el alcohol. Por otro lado, la sobreexpresión de p16 parece ser un marcador de la integración del ADN del VPH en el ADN de la célula huésped.**

En algunos casos podemos obtener resultados p16+ y VPH-. Esta disparidad puede ser debida a que nuestra PCR/hibridación no detecta determinado genotipo de VPH. En algunos casos, el marcaje de células p16+ no está relacionado con el VPH, en los que podríamos considerar realizar la hibridación para otros virus, como el Epstein-Barr por ejemplo. En otros casos, puede ser secundario a que la sobreexpresión de p16 se encuentre relacionada con otras condiciones como la senescencia<sup>20</sup>, donde la actividad viral se encuentra en estado latente.

**El supuesto contrario, es decir, que las pruebas resulten p16- y VPH+, puede ser debido a que la infección no sea la causa directa del tumor.**

## Diagnóstico por imagen

El TC y la RM han sido utilizados como técnicas de imagen para el diagnóstico y el estadiaje tumoral en CECC. Hasta la fecha, ninguna de éstas técnicas ha sido empleada para detectar la presencia de VPH en las lesiones. Sin embargo, Nakahira et al. [125] en julio de 2013 han publicado un trabajo donde utilizan la técnica de

---

<sup>19</sup> FDA= Food and Drug Administration

<sup>20</sup> Senescencia: estado donde las células son metabólicamente activas, pero incapaces de replicarse o inducir la proliferación.

difusión por resonancia magnética<sup>21</sup> para detectar aquellos CCE de orofaringe VPH+. La técnica de DWI se basa en la detección *in vivo* del movimiento de las moléculas de agua, el cual suele estar restringido en determinadas condiciones patológicas, como la isquemia y los tumores. Es larga la experiencia de su uso para la detección precoz del infarto cerebral, pero no tanto para la detección tumoral. Los radiólogos utilizan el coeficiente de difusión aparente<sup>22</sup> a partir de la imagen de la DWI como parámetro cuantitativo para poder discriminar entre lesiones benignas y malignas, y también para diferenciar recurrencias de cambios post-terapéuticos. En el estudio de Nakahira et al. demuestran que los pacientes con CCE de orofaringe VPH+ presentan ADC significativamente más reducidos que los VPH-. Sin embargo, en los tumores estudiados hasta la fecha, los ADC bajos se correlacionan con características histológicas de mal pronóstico, probablemente debido a la alta celularidad y escasa agua intercelular de las neoplasias de peor pronóstico. A pesar de esta discrepancia, la DWI es una técnica prometedora tanto para la detección de los tumores VPH+ como para la predicción de su pronóstico.

though p16 positivity was used as a surrogate marker of HPV infection. cers, as incidence  
Epidemiologic reports demonstrate that OPSCC has a lower am HPV DNA presence of about 70 % in western countries smoking :

 Springer

Imágenes 45 y 46: CCE orofaringe VPH-: RM y DWI [125]

though p16 positivity was used as a surrogate marker of HPV infection. c.  
Epidemiologic reports demonstrate that OPSCC has a HPV DNA presence of about 70 % in western countries

 Springer

Imágenes 47 y 48: CCE orofaringe VPH+: RM y DWI [125]

<sup>21</sup> DWY= Diffusion-Weighted Magnetic Resonance Imaging= Difusión por Resonancia Magnética

<sup>22</sup> ADC= Apparent Diffusion Coefficient= Coeficiente de Difusión Aparente

## PREVENCIÓN Y VACUNACIÓN

Aunque los anticonceptivos de barrera física son un método útil para la prevención de enfermedades de transmisión sexual, para evitar el contagio del VPH son un método poco recomendable, con alta variabilidad de eficacia según el estudio publicado (0-80%) [69]. Esto es debido a que el contacto íntimo, sin penetración, es suficiente para que haya contagio.

De forma alternativa, se postula que la difusión del VPH podría prevenirse mediante la vacunación mundial. Actualmente están siendo introducidas en el mercado las vacunas diseñadas para prevenir el carcinoma de cérvix, las verrugas genitales y demás. Dichas vacunas imitan las proteínas de la cápsula L1 del VPH en forma de proteínas recombinantes. Éstas no contienen ningún tipo de material genético, por lo que no tienen ningún potencial infeccioso ni oncogénico y, sin embargo, producen una buena respuesta inmunológica. Hasta la fecha existen 2 vacunas comercializadas:

- ✓ Gardasil<sup>®</sup> cuadrivalente: 6, 11, 16 y 18 (2006. Merck, USA) (administración a los 0, 2 y 6 meses). Prevención de carcinomas y condilomas.
- ✓ Cervarix<sup>®</sup> bivalente: 16 y 18 (2009. GlaxoSmithKline, Australia) (administración a los 0, 1 y 6 meses). Prevención de carcinomas.

### Inmunogenicidad

Ambas vacunas tienen la capacidad de producir una gran respuesta humoral, mucho más efectiva que los niveles de anticuerpos adquiridos después de una infección natural [126]. Comparando ambas vacunas, la bivalente produce mayores niveles de anticuerpos contra VPH 16 y 18 que la cuadrivalente, y ambas vacunas generan mayores niveles de anticuerpos que la infección natural [127-129]. Sin embargo, no queda demostrado que los altos niveles de anticuerpos produzcan mayor grado y duración de protección, ni tampoco se ha definido el nivel mínimo de anticuerpos necesarios para asegurar la prevención.

La durabilidad de los niveles de anticuerpos ha sido estudiada hasta la fecha. Se ha demostrado que los niveles protectores persisten al menos 42 meses, pero por el momento no existen datos a largo plazo [130].

### Eficacia

Varios estudios han demostrado una disminución de la incidencia en el número de contagios por el VPH y de lesiones secundarias a éstos después de implantar el uso de la vacuna contra el VPH [131-134]. Por ejemplo, un ensayo con seguimiento de 5

años ha probado un rango del 86-100% de efectividad en la prevención del VPH 16 y VPH 18 en lesiones cervicales con estadíos CIN 2/3 en mujeres jóvenes. Además, a pesar de que la vacuna se haya diseñado específicamente contra las cepas de VPH 16 y 18, se sospecha de la eficacia protectora cruzada con otros tipos de VPH, pues se ha visto que la protección de la vacuna alcanza a más del 80-90% de las lesiones de cuello de útero totales, y las lesiones provocadas por los VPH 16 y 18 no llegan al dicho porcentaje.

Estudios con ambas vacunas demuestran que la efectividad de éstas se aproxima al 90-100% en población naïf (que nunca ha entrado en contacto con el virus). En cambio, cuando estudiamos su eficacia en la población sexualmente iniciada y activa, ésta disminuye hasta valores cercanos al 50% [133,134]. Por tanto, el efecto de la vacuna en población previamente infectada es limitado, y no resulta tan efectiva para tratar ni acelerar el *clearance* de la infección. Sin embargo, hemos de insistir en que la condición de paciente añoso, sexualmente activo, con historia de infección por VPH+ o verrugas genitales, no contraindica la vacunación, simplemente que ésta se considera menos efectiva.

Específicamente, la eficacia y la seguridad de la vacuna contra el VPH en pacientes VIH+ está siendo probada en varios ensayos, resultando ser inmunogénica y segura, pero con eficacia aún no testada [135-137]. Al tratarse de una vacuna a base de partículas, sin contenido genético, resulta segura para todos los pacientes inmunocomprometidos.

### Seguridad de la vacuna contra el VPH

Como hemos dicho, ambas vacunas utilizan partículas que imitan las proteínas virales, sin contener ningún material genético, por lo que se consideran seguras y libres de riesgo de infección activa. La seguridad de la vacuna está probada a partir de los 9 años de edad. En mujeres embarazadas o lactantes no se han reportado efectos secundarios ni para la madre ni para el niño, pero todavía no se recomienda su uso.

Los efectos secundarios de la vacuna han sido recopilados desde sus fases iniciales de estudio y hasta la fecha. El más común de ellos es la reacción moderada en el sitio de inyección. El síncope post-inyección también es habitual, por lo que se recomienda que el paciente espere 15 minutos antes de levantarse. En cuanto al riesgo de Síndrome de Guillain-Barré, éste se ha cuantificado con igual frecuencia que en otras vacunas [138].

Debido a que Gardasil® lleva más tiempo comercializada que Cervarix®, existen también más estudios de seguridad, a la vez que se han reportado más efectos secundarios indeseados. Así pues, con la cuadrivalente se han

detectado varios casos de trombo-embolismo venoso, algunos de ellos con trombo-embolismo pulmonar. En la mayoría de ellos (90%) se conocía algún factor de riesgo como toma de anticonceptivos orales o historia familiar [138]. El riesgo de anafilaxia reportado es de 0.1 casos por cada 100,000 dosis distribuida [138].

### Relación coste-efectividad de la vacuna

La relación coste-efectividad de la vacunación poblacional ha sido analizada a través de estudios con modelos matemáticos. Uno de ellos sugiere que la vacunación de toda la población femenina de 12 años de los Estados Unidos prevendría más de 200,000 infecciones por VPH, 100,000 citologías anormales y 3,300 cánceres de cuello de útero, si la detección del cáncer de cuello de útero sigue realizándose como en la actualidad [139].

La vacunación disminuye su coste-efectividad a medida que la edad de vacunación aumenta. Asumiendo que la inmunidad producida por la vacuna tiene una longevidad infinita, el ratio coste-efectividad de la vacunación a los 12 años es de 43,000\$ por QALY<sup>23</sup>, pero de 152,700\$ por QALY cuando la vacunación se da a los 26 años [140].

Es importante subrayar que los estudios de coste-efectividad realizados hasta la fecha quedan sujetos a la longevidad indefinida de la protección producida por la vacuna, pues desconocemos si serán precisas nuevas dosis de recordatorio para mantener la inmunización.

Queda demostrado que es más efectivo para prevenir la infección del VPH vacunar a ambos sexos, pero no en términos de coste-efectividad, por lo que una vez más los costes de la vacuna impiden la vacunación integra de la población y a nivel mundial.

### Guías de vacunación

En los hombres la prevalencia de VPH es más alta que en las mujeres, aunque la prevalencia de enfermedad tumoral asociada a VPH en éstos es mucho menor que en las mujeres. Por esta razón, para prevenir la transmisión del VPH de hombres a mujeres y para reducir la incidencia de neoplasias asociadas al VPH en hombres, es racional incluir a los hombres en los programas de vacunación. Sin embargo, la relación coste-efectividad de la inmunización del sexo masculino es mucho menor

---

<sup>23</sup> QALY= quality-**adjusted-life-year**

que la del sexo femenino. Por esta razón, el hecho de generalizar la inmunización masculina es un tema todavía controvertido.

Como hemos mencionado anteriormente, la vacuna es más efectiva cuando es administrada antes de iniciar las relaciones sexuales, por lo que, actualmente, en las guías de los comités se recomienda la vacunación de los adolescentes y adultos jóvenes del sexo femenino entre 9 y 26 años y varones entre 11 y 21 años de edad, excepto en aquellos que practican sexo con otros hombres y/o VIH+, en los cuales la edad de vacunación debe alarga hasta los 26 años.

La Organización Mundial de la Salud sugiere que las jóvenes de entre 9 y 13 años deben ser consideradas la población diana de vacunación a nivel mundial ([www.who.int/wer](http://www.who.int/wer)), y recomienda que en los programas de salud pública de cada país se valore la inmunización de población más adulta y del sexo masculino, atendiendo a la relación coste-efectividad de la vacuna y a la detección tumoral precoz de cada país en particular.

En España, el Departamento de Salud financia la inmunización en el marco del programa de vacunaciones sistemáticas desde el 2008 para niñas de sexto de primaria, que corresponde a adolescentes de entre 11 y 12 años.

En Catalunya la vacunación contra el VPH se incorporó igualmente al calendario de vacunaciones sistemáticas en el 2008. La cobertura conseguida durante los años 2011-2012 fue del 84.3%. A pesar de que la cobertura no sea absoluta, el pequeño porcentaje de población no vacunada también queda indirectamente protegida por la menor prevalencia poblacional de infección por VPH. Es importante seguir estudiando el impacto epidemiológico y clínico de la vacuna, pues las indicaciones de ésta pueden variar.

## VPH en CCE de orofaringe

### ANTECEDENTES

Hace 30 años aproximadamente, fue postulado el rol del VPH en el carcinoma cervical uterino. Actualmente está bien establecido cómo esta heterogénea familia de virus representa un carcinógeno humano, causante no solamente de la inmensa mayoría de tumores de cuello de útero y ano-genitales, sino también de un número variable de cánceres en otras localizaciones del cuerpo humano, incluyendo cabeza y cuello [82].

Syrjänen et al. en 1983 fueron los primeros en describir la asociación entre el VPH y las lesiones celulares escamosas en distintas localizaciones del cuerpo humano, incluyendo la cavidad oral [76]. Los resultados sugirieron que el VPH estaba involucrado en el desarrollo de al menos algunos tipos de CECC. En los años siguientes, se han efectuado numerosos estudios con evidencia científica que han demostrado que las infecciones orales por VPH, sobre todo de los genotipos de alto riesgo 16 y 18, son un factor de riesgo independiente y significativo para el CECC.

Específicamente, en CECC el 15-20% de estos cánceres se dan en pacientes no fumadores ni bebedores [141-142]. La literatura revisada evidencia que el VPH es la causa de algún subtipo de estos CECC, particularmente en los localizados en el anillo de Waldeyer: amígdalas y base de lengua [40,143,144]. Estas estructuras, que se extienden desde el paladar blando hasta el dorso lingual, tienen una superficie con criptas o hendiduras profundas y retorcidas que pueden llegar a penetrar casi todo su espesor. Interiormente, el tejido es linfoide y dispuesto en nódulos o folículos. Estas dos estructuras, las amígdalas y el tercio posterior de la lengua, parece ser que son más susceptibles a la transformación maligna por acción del VPH. La razón todavía permanece incierta, pero se cree que puede ser debido a que las profundas invaginaciones de la superficie mucosa dificultan el aclarado salival y favorecen la captura y procesado de los antígenos, lo cual facilita el acceso viral a las células basales y su permanencia en el tejido.

Desde la década de los 90's múltiples líneas de investigación han corroborado un incremento de CCE de orofaringe VPH+: mientras que en 1980 solamente el 16% de tumores de orofaringe se relacionaban con el VPH, en el 2000 se asociaron alrededor del 60-70% de los casos [44].

AUTOR y AÑO	TIPO DE ESTUDIO	PAIS ESTUDIO	NUMERO PACIENTES	PERIODO ESTUDIO	LOC. TUMOR	CONCLUSIONES
Settle [11] 2009	Prospectivo	EEUU	211	1995-2006	Cabeza y cuello	Incidencia VPH -población caucásica:34%

						-población de color:4% -orofaringe:49%
<b>Chaturvedi [44] 2011</b>	Retrospectivo	EEUU	271	1984-2004	Orofaringe	Aumento de incidencia de CCE de orofaringe VPH+ -1984-1989: 16'3% -2000-2004: 71'7%
<b>Fakhry [63] 2008</b>	Prospectivo	EEUU	96	1999-2007	Orofaringe y laringe	Incidencia de VPH+ en el 40% de los tumores de orofaringe y laringe
<b>Syrjänen [76] 2005</b>	Prospectivo	Finlandia	422 amígdala 4768 cav oral 322 seno-nasal	<2002	Amígdala, cavidad oral seno-nasal	Incidencias VPH+ -amígdala: 51% -cav oral: 22% -seno-nasal: 22%
<b>Schwartz [100] 1989</b>	Caso control	EEUU	Casos (284) controles (477)	1990-1995	Cavidad oral	Resultados parecidos de VPH+ en casos y controles (26%)
<b>Soares [120] 2008</b>	Retrospectivo	Brasil	33		Cavidad oral	Detección de VPH+ en el 33% de los casos, y con sobreexpresión de pRb
<b>Gillison [141] 2000</b>	Prospectivo	EEUU	253	1987-1998	Cavidad oral	Detección de VPH+ en el 25% de los casos
<b>Attner [143] 2010</b>	Retrospectivo	Suecia	109	1998-2007	Base de lengua	Aumento de incidencia de CCE de base de lengua VPH+ -1998-2001: 58% -2004-2007: 84%
<b>Machado [152] 2010</b>	Retrospectivo	Canadá	92	1995-2007	Cabeza y cuello	Incidencias CECC VPH+ -orofaringe (73%) -cavidad oral (4%) -otros (6%)

Tabla 10: comparativo de estudios epidemiológicos que relacionan el VPH con el CECC (por orden bibliográfico)

En un estudio sobre la incidencia del VPH en el carcinoma de cavidad oral y orofaringe realizado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer, se detectó la presencia del VPH en un 70% de los casos [77]. El VPH 16, el tipo más observado en el carcinoma genital, fue también el más común en este estudio. Sin embargo, otros estudios de revisión concluyen que la incidencia de la presencia de ADN viral varía entre el 18-50% dependiendo del área geográfica estudiada [145,146]. En definitiva, la mayoría de los estudios concluyen que el VPH parece jugar un papel etiológico importante en gran cantidad de carcinomas de orofaringe y en un subgrupo menor de carcinomas de cavidad oral, pero con alta variabilidad geográfica [11,44,63,76,100,117,120,141-146].

## CAMBIOS EN LA PRESENTACIÓN CLÍNICA

Los estudios demuestran que la edad de los pacientes con tumores de orofaringe asociados al VPH es menor que la de los fumadores y/o bebedores. En realidad, de acuerdo con la disminución de pacientes fumadores y/o bebedores y el aumento de transmisión del VPH, desde el 1976 hasta el 2004 la proporción de pacientes con tumores de orofaringe de 40 a 59 años de edad incrementó del 35 al 45%, mientras

que la proporción de pacientes con edad comprendida entre los 60 y los 79 años decreció del 52 al 40% [147].

Inicialmente, los estudios apuntaban a que la incidencia entre sexos debía ser parecida, pero parece ser que los CCE de orofaringe relacionados con el VPH también son más prevalentes en los hombres que en las mujeres [95,148].

En cuanto a la probabilidad de transmisión del VPH es determinante la historia de múltiples compañeros sexuales y/o la práctica de sexo oro-genital [102]. Parece además estar más vinculado a la población de nivel socio-económico medio-alto [41,149].

La relación con los hábitos tóxicos del tabaco y el alcohol no es necesaria para el desarrollo de la enfermedad tumoral, pero varios estudios han relacionado el tabaco con resultados de VPH+ en cavidad oral, por lo que se puede relacionar el tabaquismo con una mayor probabilidad de infección o de persistencia del VPH cuando existe el contacto con éste. En cuanto al pronóstico tumoral, éste es peor cuando el paciente es fumador, con una mayor progresión de la enfermedad loco-regional [95].

En definitiva, se ha observado que los pacientes con CECC VPH+ y VPH- presentan características epidemiológicas bien distintas [41,82,95,102,142,147-151]:

✓ CECC VPH-:

- ☞ hombre>mujer
- ☞ Edad más avanzada
- ☞ Nivel socio-económico bajo
- ☞ Localización: CECC
- ☞ Asociado al tabaco y al alcohol
- ☞ No relacionado con la conducta sexual
- ☞ Menor afectación ganglionar cervical
- ☞ Peor respuesta al tratamiento y peor pronóstico

✓ CECC asociado a VPH+:

- ☞ hombre>mujer
- ☞ Edad menos avanzada
- ☞ Nivel socio económico medio-alto
- ☞ Localización: orofaringe más prevalente
- ☞ No precisan ser ni fumadores ni bebedores
- ☞ Conducta sexual de riesgo: sexo oro-genital
- ☞ Mayor afectación ganglionar cervical N2
- ☞ Mejor respuesta al tratamiento y mejor pronóstico

## ¿EL MEJOR PRONÓSTICO EN PACIENTES VPH+ IMPLICA CAMBIAR LA PAUTA DE TRATAMIENTO?

Tal y como se ha resaltado anteriormente, los pacientes diagnosticados de CCE de orofaringe VPH+ son aproximadamente 10 años más jóvenes que los VPH-. Esta diferencia de edad implica una menor comorbilidad y un mejor estado general del paciente, mayor tolerancia del tratamiento, así como un pronóstico mucho más favorable. La comorbilidad del enfermo con CECC compromete la supervivencia general, pero no la relacionada con el cáncer ni la recurrencia. Es interesante subrayar que el pronóstico favorable de los pacientes con CCE de orofaringe VPH+ es específico para aquellos pacientes con baja comorbilidad en el momento diagnóstico [152-154]. En cuanto al hábito tabáquico, repetir que el pronóstico empeora cuando el paciente es fumador, con mayor progresión de la enfermedad loco-regional [95].

Por otra parte, los estudios moleculares demuestran que el aumento de la expresión de p16 y valores reducidos del receptor de factor de crecimiento epidérmico<sup>24</sup> son marcadores de buen pronóstico en los CECC VPH+ [155]. Asimismo, estos pacientes con sobreexpresión de p16 presentan mejor respuesta al tratamiento, independientemente del tratamiento aplicado, aunque actualmente aún no se conozca la razón [122]. Tal y como hemos citado anteriormente, algunos autores sólo aceptan como tumores asociados al VPH aquellos con alta expresión de p16 y positivos a VPH con PCR-hibridación *in situ*, ya que han demostrado que solamente estos pacientes tienen mejor respuesta al tratamiento y mejor pronóstico [124,156,157].

A pesar de que los tumores de orofaringe VPH+ se presentan habitualmente con metástasis ganglionares cervicales, los estudios concluyen que los pacientes con CECC VPH+ tienen mejor respuesta al tratamiento, menor probabilidad de presentar segundos tumores primarios [158,159] y un riesgo de morir por causa tumoral un 60-80% menor que los pacientes VPH- [81]. Además, la invasión extracapsular ganglionar no se considera un factor que altere la supervivencia en los tumores VPH+ [160].

A pesar de todos los estudios publicados referentes a la distinta forma de presentación y pronóstico de los tumores de orofaringe según la asociación o no de éstos al VPH, actualmente aún no ha cambiado el estadiaje TNM de la AJCC (American Joint Committee on Cancer). Es posible que las asociaciones

---

<sup>24</sup> EGFR= Epidermal Growth Factor Receptor= Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

de oncología empiecen a plantearse una modificación de éste, como ha ocurrido en las clasificaciones de otros tumores, como el de mama con el gen BRCA<sup>25</sup>, por ejemplo.

En cuanto a la mejor respuesta al tratamiento, se han propuesto diversas teorías: algunos autores defienden que es debido a que las células tumorales VPH+ son capaces de inducir apoptosis celular cuando el ADN se lesiona. También se ha sugerido que los bajos pero aún funcionales valores de p53 en las células neoplásicas VPH+ pueden ser activados mediante la radiación y así iniciar la apoptosis celular [161]. Otros autores lo atribuyen a la ausencia de cambios genéticos precoces inducidos por el carcinógeno en el epitelio y/o al desarrollo de tumores multifocales [85]. De hecho, la represión de la expresión de E6 y E7 en los carcinomas VPH+ conlleva la restauración de los niveles de pRb y p53, que suele ser suficiente para detener el crecimiento celular y/o recuperar la apoptosis celular [162]. Además, las vacunas que estimulan una respuesta inmune citolítica de las células que expresan proteínas virales pueden jugar un importante papel terapéutico, incluso en estadíos avanzados de la enfermedad [162].

En estudios recientes se ha demostrado que de los pacientes con CCE de orofaringe VPH+ ya tratados y libres de enfermedad, parte de ellos tiene carga de ADN viral indetectable, otros presentan ADN pero no contagioso, y un tercer grupo presenta riesgo de ser fuente de contagio [88].

En conclusión, la posible diferencia de pronóstico y de respuesta al tratamiento de los tumores VPH+ obliga a una revisión terapéutica a fin de valorar la aplicación de un tratamiento menos agresivo e igualmente efectivo y curativo, para así disminuir la morbilidad del paciente. Con menores dosis de RT y QT y reduciendo la agresividad quirúrgica o incluso suprimiendo ésta última, el paciente se evitaría algunos efectos secundarios tales como mucositis, disfunción deglutoria, xerostomía, alteraciones dentales y óseas, etc. Sin embargo, todavía no tenemos datos lo suficientemente significativos para implementar este cambio [43,163-165], por lo que la pauta de tratamiento de los tumores de orofaringe VPH+ sigue siendo como la de los tumores de orofaringe en general.

## ¿LA VACUNA CONTRA EL VPH RELACIONADO CON EL CUELLO DE ÚTERO ES EFECTIVA PARA PREVENIR EL CÁNCER DE OROFARINGE?

---

<sup>25</sup> BRCA= breast cancer

La prevención de los CCE de orofaringe VPH+ puede conseguirse a través de 2 vías: una a través de la vacuna profiláctica contra el VPH (prevención primaria) y otra interrumpiendo la progresión de la enfermedad mediante su diagnóstico y tratamiento precoz (prevención secundaria). Así como la vacunación parece ser un método prometedor, todavía no se ha aprobado ningún método de *screening* para el CCE de orofaringe VPH+ eficaz, en términos comparativos al existente para la detección del carcinoma de cuello de útero [166].

En cuanto a la vacuna, ésta podría ser útil para prevenir e incluso tratar los tumores VPH+, pero actualmente esta hipótesis aún está en fase de estudio. Por el momento, los estudios realizados sólo han demostrado un efecto protector y una disminución en el desarrollo de CECC VPH+ [58,64,165].

A nivel terapéutico, la vacuna probablemente podría ser útil para las enfermedades tumorales de pequeña extensión. Así, estas vacunas podrían usarse como tratamiento adyuvante de la cirugía, la QT o la RT, aumentando la respuesta inmune. También sigue pendiente de estudio la comprobación de si la misma vacuna utilizada para prevenir el carcinoma ano-genital, resultaría igualmente útil en estos pacientes con CECC.

Además, hay que destacar que si las hipótesis anteriormente citadas quedaran demostradas definitivamente, la inmunización no debería restringirse solamente al sexo femenino, como ocurre actualmente por ejemplo en España.

Actualmente se está investigando la presencia de marcadores tumorales útiles para un diagnóstico precoz, para la monitorización del curso de la enfermedad, y para la detección precoz de recurrencia de la enfermedad en los pacientes con CECC VPH+. Sin embargo, en los estudios realizados hasta la fecha los tumores VPH+ presentan menor tasa de recurrencia que los VPH- [167].

La presencia de anticuerpos contra el VPH podría ser un marcador de detección viral fácilmente accesible. El sistema inmune produce anticuerpos contra las proteínas de la cápsula viral y contra las proteínas virales tempranas, incluyendo las oncoproteínas E6 y E7. La relación entre los niveles de anticuerpos y la presencia de células tumorales VPH+ podría utilizarse también para el diagnóstico precoz, para la monitorización del curso de la enfermedad, y para la detección precoz de recurrencia de la enfermedad [168].

Aproximadamente el 10% de los individuos sanos con infección por VPH desarrollan una infección persistente, y quizás estos pacientes serían los que más se beneficiarían de la monitorización de los niveles de anticuerpos contra el VPH [169].

## PREGUNTAS FRECUENTES DEL PACIENTE DIAGNOSTICADO DE VPH+

Es frecuente que al paciente diagnosticado de un tumor de orofaringe secundario a una enfermedad de transmisión sexual le surjan dudas y preguntas, por lo que es importante estar preparado ante posibles comentarios comprometedores como [170]:

✓ ¿Qué es el VPH?

☞ Es una enfermedad de transmisión sexual que puede infectar genitales, ano, cavidad oral y orofaringe, sobretodo. En la mayoría de los casos la infección desaparece en 6-12 meses, pero en otros no es así, y las infecciones persistentes pueden provocar cancerización del tejido infectado.

✓ ¿Qué significa que mi tumor sea VPH+?

☞ En general se traduce en mejor supervivencia, mejor respuesta al tratamiento, menor recurrencia y mejor pronóstico.

✓ ¿Cómo afecta el hábito tabáquico?

☞ Varios estudios han relacionado el tabaco con VPH+ oral, por lo que se puede relacionar el tabaquismo con una mayor probabilidad de contagio y de persistencia viral cuando existe el contacto con el VPH [95].

☞ En cuanto al pronóstico, éste es peor cuando el paciente es fumador, con mayor progresión de la enfermedad loco-regional.

✓ ¿Cómo me contagié?

☞ El VPH es una enfermedad de transmisión sexual que puede infectar el epitelio de la orofaringe, cavidad oral y tracto ano-genital. El contacto entre mucosas es suficiente para el contagio, la penetración no es indispensable. Un número elevado de compañeros sexuales y la práctica de sexo oral-genital favorecen la infección, pero la presencia de VPH no es en sí mismo un indicador de promiscuidad.

☞ Alrededor del 80% de los jóvenes sexualmente activos en algún momento de su vida han estado o estarán en contacto con el VPH a nivel genital, aunque en la mayoría de ellos sea de forma asintomática [65]. Además, en la mayoría de los casos la infección desaparece en menos de 1 año. En los casos en los que no existe este *clearance*, la infección persistente del VPH puede generar lesiones premalignas e incluso malignas.

☞ La detección del VPH en la cavidad oral es menos frecuente, y ésta lo es más en los hombres que en las mujeres. La mayoría de infecciones orales también desaparecen en 1-2 años, pero las que persisten conllevan riesgo de cancerización [95,148].

✓ La causa de los CECC VPH+ es el sexo oral?

- ☞ La relación del contagio con el sexo oro-genital y oro-anal está demostrada. Menos concluyente es su relación con los besos profundos con lengua.
- ✓ ¿Presentar VPH+ oral significa ser o haber sido promiscuo?
  - ☞ Esta relación directa es incorrecta, ya que solamente con un compañero sexual infectado es suficiente para adquirir la infección.
- ✓ ¿Cuándo contraí el VPH oral?
  - ☞ En el momento del diagnóstico del CCE no podemos saber cuándo hubo la transmisión. Extrapolando a partir de los resultados de los estudios que se han publicado hasta la fecha, seguramente la infección se produjo años e incluso décadas atrás. De hecho, se estima que es preciso el transcurso de un mínimo de 10-15 años desde la infección por VPH para producir cancerización del tejido subyacente [86,87].
- ✓ ¿Mi pareja me ha engañado?
  - ☞ La infección primaria seguramente fue años atrás. Además, actualmente no podemos descartar otras vías de infección. Varias vías de transmisión alternativas están siendo estudiadas, como el boca-boca profundo y el canal del parto.
- ✓ ¿Soy una posible fuente de infección?
  - ☞ El contacto no sexual es de improbable riesgo, aunque aún no podemos descartar opciones. Los besos profundos “con lengua” pueden presentar también riesgo de contagio.
  - ☞ En el caso de tratarse de una pareja sexual estable y antigua, ésta ya ha estado expuesta al VPH del paciente, por lo que no es necesario cambiar los hábitos sexuales. Debemos destacar que un porcentaje importante de la población ha estado en contacto con el VPH y lo ha expulsado de forma espontánea, adquiriendo inmunidad natural.
  - ☞ En cuanto a las parejas sexuales futuras, el riesgo real no se conoce, pero debería evitarse el contagio como lo haríamos con cualquier enfermedad de transmisión sexual. Como venimos repitiendo, la mayoría de las personas que adquieren el VPH lo hacen de forma asintomática, y del mismo modo la positividad del VPH suele desaparecer en unos meses.
  - ☞ Afortunadamente, se ha demostrado que parte de los pacientes tratados tienen cargas de ADN viral indetectables, otros presentan ADN pero no contagioso, y un tercer grupo presenta riesgo de ser fuente de contagio [88].
- ✓ ¿Mi/s compañero/s sexuales deberían chequearse?

- ☞ La mayoría de infecciones orales desaparecen en 1-2 años. Actualmente no hay evidencia que los compañeros sexuales deban ser chequeados si no presentan ninguna clínica, ya que todavía no hay ningún método de *screening* eficaz.
- ✓ Mi esposo/a tiene más riesgo de presentar un tumor relacionado con el VPH?
  - ☞ Algunos estudios han sugerido que los esposos de las mujeres con cáncer de cuello de útero tienen 2-3 veces más riesgo de padecer un CCE de orofaringe VPH+, pero aún necesitamos realizar más estudios para extraer conclusiones [104].
- ✓ ¿Son de utilidad las vacunas?
  - ☞ La vacunación previo contacto es muy efectiva para prevenir la infección y consecuentemente el cáncer ano-genital, pero no lo es tanto cuando ya existe contagio. Todavía no ha sido testada para la prevención del CCE de orofaringe, aunque por extrapolación de datos debería serlo. Desafortunadamente, la vacuna no es efectiva para hacer que desaparezca la infección.

## JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO

El CECC es una parte muy importante de la patología tratada habitualmente por el cirujano maxilofacial, y en el Servicio del Hospital Vall d'Hebron (Hospital de referencia de Catalunya) es la más destacada por volumen y por repercusión social. El volumen de pacientes es considerable si tenemos en cuenta que los CECC constituyen la quinta localización en frecuencia de cáncer a nivel mundial. En consecuencia, se invierte mucho para conseguir la excelencia en el tratamiento del paciente oncológico de cabeza y cuello. Ello incluye tanto una constante investigación, como la indispensable revisión de la literatura publicada sobre nuevas técnicas quirúrgicas, tratamientos oncológicos, avances tecnológicos, marcadores tumorales, etc, mostrando como ejemplo este trabajo.

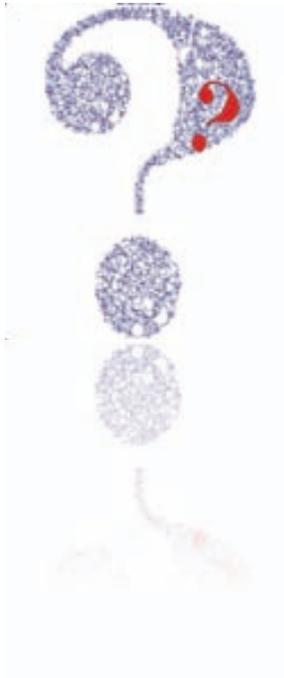
Ha sido demostrado en distintos estudios que el VPH repercute sobre el CECC a nivel epidemiológico, en cuanto a su pronóstico y, en consecuencia, en relación a su tratamiento. Dado el mejor pronóstico de estos pacientes [4], se ha propuesto en numerosas publicaciones aplicar pautas de tratamiento menos agresivas y así disminuir la morbilidad secundaria en estos pacientes. Sin embargo, todavía no se han descrito guías terapéuticas menos agresivas y que sean igual de efectivas en el subgrupo de pacientes VPH+/p16+.

Estudios epidemiológicos en Estados Unidos y en países del norte de Europa han reportado una incidencia de CECC relacionados con el VPH superior al 60% [5]. Sin embargo no existen estudios epidemiológicos publicados de nuestro entorno geográfico, aunque algunos estudios preliminares hablan de una incidencia del 20-30%.

Por lo tanto, dada la relevancia del tema y las incógnitas existentes en nuestro medio sobre la posible incidencia de este nuevo grupo de pacientes con CECC, decidimos realizar un estudio retrospectivo en un grupo de pacientes tratados en el Hospital Vall d'Hebron, con la intención de analizar las características epidemiológicas, clínicas y la evolución en el grupo de pacientes portadores del VPH comparado con los no portadores. Esto nos permitirá en un futuro analizar la respuesta al tratamiento de estos pacientes VPH+ comparada con la de los pacientes fumadores y/o bebedores, y la posibilidad de atenuar las pautas de tratamiento. Pero antes es imprescindible estudiar el impacto epidemiológico de la infección por el VPH en nuestros pacientes afectados de CECC. No debemos menospreciar la gran prevalencia que tienen en nuestra población el tabaco y el alcohol, ambos factores de riesgo socialmente muy aceptados, y todavía muy presentes en nuestra población.

Nuestro trabajo también trata de analizar las pruebas de detección del VPH y su eficiencia, ya que son técnicas con un coste elevado. En el Hospital Vall d'Hebron se realiza PCR para detectar ADN del VPH y tinción inmunohistoquímica de p16 sobre todo como marcador tumoral de buen pronóstico. Para el presente estudio se han realizado ambas pruebas a todos los pacientes para corroborar el diagnóstico, así como para valorar cuál de ellas resulta más efectiva, y poder optimizar recursos en un futuro próximo.

## HIPÓTESIS



Las infecciones del tracto aéreo-digestivo superior por VPH pueden ser asintomáticas o bien manifestarse en forma de lesiones hiperplásicas benignas o malignas.

- ✓ Un porcentaje de pacientes con CECC de nuestra serie tienen asociado algún VPH de genotipo de alto riesgo oncológico, el cual es un factor de riesgo independiente y significativo en el desarrollo del CECC, y éste factor de riesgo puede presentarse asociado a otros o bien de forma aislada.
- ✓ Los pacientes con CECC VPH+ presentan características epidemiológicas y clínicas distintas a las de aquellos VPH-.
- ✓ Los pacientes con CECC VPH+ presentan mejor pronóstico que aquellos VPH-.
- ✓ Es adecuado llevar a cabo la detección de VPH mediante tinción inmunohistoquímica de p16 y técnica de PCR-hibridación *in situ*.

## OBJETIVOS

En el presente estudio queremos probar los siguientes objetivos

1. Demostrar la existencia de infección por VPH en ciertos pacientes de nuestra muestra afectos de CECC, mediante las siguientes pruebas de detección en el material histológico de cada uno de ellos:
  - a. tinción inmunohistoquímica de p16
  - b. técnica de PCR-hibridación *in situ*
2. Examinar qué impacto epidemiológico tiene el VPH en nuestra muestra de pacientes afectos de CECC.
3. Estudiar y comparar entre el grupo de pacientes VPH+ y el grupo VPH-, las características de presentación y evolución clínica de la enfermedad oncológica.
4. Valorar la aplicabilidad de las antes mencionadas pruebas diagnósticas, para sugerir un protocolo de detección de VPH en pacientes diagnosticados de CECC.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### POBLACIÓN

Hemos realizado un estudio retrospectivo que incluye una serie de pacientes con carcinoma escamoso en la región de cabeza y cuello, asistidos en el Hospital Vall d'Hebron entre el mes de noviembre de 2009 y el de diciembre de 2010.

### CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ✓ Pacientes con diagnóstico primario de CECC.
- ✓ CECC considerados como segundos tumores primarios. Consideramos un tumor como un segundo primario cuando la localización es completamente distinta, o cuando la lesión se halla en la misma localización y el paciente ha permanecido cinco años libre de enfermedad.
- ✓ Casos clínicos con muestra histológica existente y suficiente para llevar a cabo los estudios de detección.

### CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- ✓ Pacientes con tumoraciones fuera de la cavidad oral o faringe.
- ✓ Pacientes con tumores de tipo histológico distinto al CCE.
- ✓ Los casos con material histológico solamente de PAAF se han descartado, para evitar interferencias de la técnica diagnóstica con los resultados. Al desconocer la efectividad de las técnicas diagnósticas en muestras histológicas de PAAF, estos casos han sido desechados.
- ✓ Episodio de CECC considerados como recidivas en pacientes tratados antiguamente de CECC (considerándose como recidiva cuando el paciente está menos de 5 años libre de enfermedad).
- ✓ También se han excluido aquellos pacientes que han abandonado el tratamiento o el seguimiento con nuestro equipo (hasta diciembre de 2012).

### METODOLOGÍA DE ACTUACIÓN ANTE EL PACIENTE CON CECC

Los enfermos llegan a nuestra consulta por una de las siguientes vías:

- ✓ Remitidos directamente del servicio de urgencias de nuestro hospital, tras ser valorados por el especialista de guardia.
- ✓ Remitidos por especialistas de otros centros.
- ✓ Remitidos por médicos de otras especialidades a las consultas externas como pacientes de diagnóstico rápido.

## Protocolo de diagnóstico

El diagnóstico y evaluación de cualquier paciente oncológico incluye:

1. En la **anamnesis** se recogen los siguientes datos: edad, antecedentes médicos, quirúrgicos, medicación, alergias, hábitos tóxicos y otros factores de riesgo, exposición laboral.
2. **Historia oncológica**: antecedentes oncológicos e historia oncológica actual: forma de debut y evolución clínica de la lesión.
3. **Exploración física** de toda la región y de forma específica la propia lesión, y se constata la existencia de posibles adenopatías cervicales.



Imagen 49: CCE de suelo de boca

También se valora el estado general del paciente y si existe otra sintomatología acompañante que nos pueda generar sospechas de extensión tumoral a distancia.

4. Valoración del **estado nutricional y psicológico** del enfermo y facilitar el soporte necesario tanto al paciente como a la familia de éste.
5. **Pruebas complementarias** de imagen para valorar el estadiaje de la lesión tumoral. En nuestro centro la prueba de elección es la RM. Es preferible realizar la prueba de imagen antes de realizar la biopsia, para evitar distorsiones secundarias a la inflamación local.

En algunas ocasiones es preciso realizar una PET, si existen dudas en el diagnóstico del proceso proliferativo o de extensión.

Realizamos una ortopantomografía para valorar el estado de salud dental del paciente, con la intención de que ésta sea restablecida en la medida de lo posible para evitar complicaciones como las sobreinfecciones y/u osteoradioquímico-necrosis secundarias al tratamiento.

6. El **diagnóstico histológico** lo realizamos mediante una biopsia o una PAAF si la lesión no es alcanzable. En caso de palpar adenopatías cervicales, realizamos una PAAF de éstas. El estudio histológico para el diagnóstico es

llevado a cabo por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Vall d'Hebron.

### Protocolo de estadificación

De acuerdo con la clasificación TNM de la UICC (Union Internationale Contre le Cancer) y la AJCC (American Joint Committee on Cancer) [31].

- ✓ Estadío 0: Tis N0 M0
- ✓ Estadío I: T1 N0 M0
- ✓ Estadío II: T2 N0 M0
- ✓ Estadío III: T1,T2,T3 N1 M0
- ✓ Estadío IV
  - ☞ A: T1,T2,T3 N2 M0 o T4a N0,N1,N2 M0
  - ☞ B: T1,T2,T3,T4 N3 M0 o T4b N1,N2,N3 M0
  - ☞ C: cualquier T, cualquier N, M1

### Protocolo de tratamiento

Los pacientes son valorados de forma personalizada por el Comité de Oncología de Cabeza y Cuello del Hospital Vall d'Hebron. Después de mantener una discusión con el equipo multidisciplinario, se decide la mejor opción terapéutica para cada paciente de modo individualizado, rigiéndonos por el Protocolo de Oncología de Cabeza y Cuello del Hospital Vall d'Hebron, el cual se basa en la clasificación TNM de la UICC (Union Internationale Contre le Cancer) y la AJCC (American Joint Committee on Cancer) [31].

- ✓ Enfermedad de estadiaje precoz, sin afectación ganglionar: estadíos I y II  
⇒ cirugía y/o RT.
- ✓ Enfermedad avanzada loco-regionalmente, con afectación ganglionar: estadíos III, IVa y IVb ⇒ terapia combinada de cirugía, RT y QT (de inducción, concomitante o adyuvante).
- ✓ Enfermedad con metástasis a distancia: estadío IVc y enfermedad recurrente ⇒ en los casos de enfermedad intratable, puede aplicarse tratamiento paliativo con QT. En los casos de recidiva, el tratamiento variará dependiendo de la terapia recibida anteriormente y de las características del tumor.

Los pacientes son informados debidamente del plan de estudio y terapéutico que se les va a aplicar, tras lo que firman el consentimiento informado indicado antes de iniciar cualquier terapia.

## Protocolo de seguimiento

- ✓ Controles post-quirúrgicos inmediatos → exploración física para seguir la evolución de las heridas quirúrgicas, según criterio clínico el primer mes\*.
- ✓ Controles post-RT/QT inmediatos → exploración física para seguir la respuesta al tratamiento y evaluar el estado general del paciente, según criterio clínico el primer mes\*.
- ✓ Controles post-tratamiento tardío → evolución / detección de recidivas
  - ☛ Controles clínicos con exploración física cada 1-3 meses durante el primer año, cada 2-6 meses durante el segundo año, semestrales durante el tercer y cuarto años, y anuales a partir de los cinco años\* [32,40].
    - Valoración del habla, de la masticación y de la deglución con indicación de rehabilitación si se cree necesario.
    - Consejo tabáquico y de alcohol si precisa.
    - Prueba de imagen de tórax periódica si el paciente es o fue fumador.
    - Valoración de la salud dental, sobretudo en los que han recibido RT.
    - Test de hormonas tiroideas cada 6-12 meses en los que han recibido RT cervical.
  - ☛ RM a las 12 semanas post-tratamiento. Repetición anual hasta los 5 años o dependiendo de la simptomatología\*. Realizamos PET si existen dudas de recidiva.

\*frecuencia sujeta a criterio clínico según paciente

## SELECCIÓN, ESTUDIO Y SEGUIMIENTO DE LOS PACIENTES

Se ha realizado una inclusión consecutiva y una muestra de conveniencia.

Todos pacientes incluidos en la tesis habían seguido las pautas anteriormente citadas en los protocolos de diagnóstico, estadiaje, tratamiento y seguimiento de los pacientes con CECC.

Es importante destacar que la decisión de la terapia que debían recibir los pacientes no estaba en absoluto influenciada por el resultado de la detección del VPH, puesto que el estudio ha sido realizado *a posteriori*.

Se ha analizado la presencia de VPH mediante PCR y marcaje de p16 en las muestras histológicas de las lesiones tumorales de todos ellos. Los 156 pacientes

seleccionados han sido clasificados en dos grupos según el resultado de VPH positivo o negativo.

El seguimiento de los pacientes se ha mantenido hasta pasados 24 meses del diagnóstico inicial de cada paciente, con la intención de analizar la supervivencia y el pronóstico a corto plazo en cada grupo. Es decir, la fecha del final del seguimiento de cada paciente es distinta, y depende de la fecha del diagnóstico (24 meses después del diagnóstico).

## ESTUDIO DE LA LESIÓN TUMORAL

Se han recuperado las muestras histológicas de los 156 pacientes seleccionados, las cuales habían estado incluidas con parafina, fijadas en formol y teñidas con hematoxilina-eosina.

El patólogo ha revisado las muestras confirmando el diagnóstico, ha realizado la técnica inmunohistoquímica para p16 y ha remitido la muestra a Biología Molecular para la detección de VPH mediante PCR e hibridación *in situ*, que detecta los siguientes genotipos de VPH:

- ✓ Alto riesgo: 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 59, 66, 67, 68, 69, 70, 73, 82 y 85.
- ✓ Bajo riesgo: 6, 11, 32, 40, 42, 44, 54, 55, 61, 62, 64, 71, 72, 74, 81, 83, 84, 87, 89 y 91.

En cada PCR se ha realizado el control de calidad de PCR de actina (217 pb).

En conclusión, hemos realizado ambas pruebas diagnósticas (p16 y PCR- hibridación *in situ*) en todos y cada uno de los casos.



Imagen 50: pieza quirúrgica de maxilectomía superior

## VARIABLES A ESTUDIAR

Se han estudiado en ambos grupos los siguientes factores

- ✓ Edad en años en el momento diagnóstico
  - ☞ variable continua
- ✓ Sexo

- ☞ variable dicotómica: hombre; mujer
- ✓ Factor de riesgo consumo de tabaco
  - ☞ variable categórica: fumador/exfumador a diario y con dependencia; no fumador o fumador ocasional
- ✓ Factor de riesgo consumo de alcohol
  - ☞ variable categórica: bebedor/exbebedor a diario y con dependencia; no bebedor o bebedor ocasional
- ✓ Localización del tumor según exploración física y RM
  - ☞ variable categórica: lengua, encía o trigono retromolar, orofaringe, suelo de boca, mucosa yugal, labio, paladar y primario desconocido
- ✓ Historia antigua de CECC corroborada con informe médico
  - ☞ variable categórica: primer episodio; historia de enfermedad oncológica de CECC
- ✓ Estadíaje TNM en el momento diagnóstico mediante RM de acuerdo con la clasificación de la UICC (Union Internationale Contre le Cancer) y la AJCC (American Joint Committee on Cancer)
  - ☞ variable categórica: T1; T2; T3; T4
  - ☞ variable categórica: N1; N2; N3
  - ☞ variable categórica: M0; M1
- ✓ Fecha de diagnóstico
  - ☞ variable temporal
- ✓ Fecha de último control
  - ☞ variable temporal
- ✓ Status en el último control
  - ☞ variable dicotómica: vivo; muerto
- ✓ Recidiva detectada mediante RM
  - ☞ variable dicotómica: sí; no
- ✓ Detección de VPH mediante PCR – hibridación *in situ*
  - ☞ variable dicotómica: positivo; negativo
- ✓ Detección de VPH mediante tinción inmunohistoquímica p16
  - ☞ variable dicotómica: positivo; negativo
- ✓ Detección de VPH mediante 2ª técnica de PCR– hibridación *in situ*
  - ☞ variable dicotómica: positivo; negativo

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó para el análisis el paquete estadístico SPSS versión 15. Antes del análisis se realizó un control de calidad de los datos mediante la revisión del 10% de las historias clínicas introducidas. La prevalencia de casos positivos entre los contactos se expresó en frecuencia y porcentaje con respecto al total de los contactos estudiados. El análisis descriptivo de las características de los pacientes se describió mediante frecuencias y porcentajes en el caso de variables categóricas; para las variables continuas se utilizó la mediana y rango mínimo-máximo. La comparación de la variable respuesta (positividad a VPH) con las variables categóricas se realizó utilizando el test de Chi al cuadrado o el Test exacto de Fisher. Para las variables continuas se utilizó el test U de Mann-Whitney.

Se comprobó la distribución aleatoria de los valores perdidos según edad y sexo. No se analizaron las variables con más de un 80% de valores perdidos. Se consideró un punto de corte para la significación estadística valores de p inferiores a 0,05.

## **ANÁLISIS DE SENSIBILIDAD**

Se definieron tres escenarios diferentes para el análisis de la variable respuesta: positividad a VPH mediante la detección de p16; positividad a VPH mediante la detección por PCR y positividad a VPH mediante la detección del virus por cualquier de las dos técnicas anteriores. En cada uno de ellos se analizó la relación entre la positividad al virus y el resto de variables incluidas en el estudio.

## **CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité de Ética del HUVH.

## RESULTADOS

### DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA

Inicialmente fueron seleccionados 205 pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello, de los cuales fueron descartados 21 por tratarse de tumores fuera del tracto aéreo-digestivo superior; 16 por ser de histología distinta al CCE; 7 por no tener muestra histológica que cumpliera los criterios de inclusión (6 de ellos habían estado diagnosticados mediante PAAF y uno de ellos la biopsia había sido realizada en otro centro y ninguno de ellos había recibido cirugía) y 5 por no haber seguido controles en nuestro centro.

En definitiva, en el estudio hemos incluido 156 pacientes con CECC, de los cuales 107 (68.6%) eran hombres y 49 (31.4%) son mujeres. La edad media fue de 62 años (con un rango de edades entre los 25 y los 98 años). De todos los casos, 141 (90.4%) pacientes eran nuevos, mientras que los otros 15 (9.6%) habían sido tratados anteriormente de una tumoración oral, considerándose este episodio un segundo tumor primario.

VARIABLE		N	(%)
Sexo	femenino	49	(31.4)
	masculino	107	(68.6)
2º tumor primario	no	141	(90.4)
	sí	15	(9.6)
Localización	lengua	44	(28.2)
	encía/trígono retromolar	41	(26.3)
	orofaringe	31	(19.9)
	suelo de boca	12	(7.7)
	mucosa yugal	11	(7.1)
	labio	8	(5.1)
	paladar	7	(5.1)
	primario desconocido	2	(1.3)
Hábito tabáquico	sí	89	(57.1)
	no	67	(42.9)
Hábito enólico	sí	31	(19.9)
	no	125	(80.1)

Tabla 11: descripción estadística de la muestra

Las localizaciones de la tumoración fueron: lengua (44 casos; 28.2%), encía o trígono retromolar (41 casos; 26.3%) y orofaringe (anillo de Waldeyer: base de lengua y amígdalas) (31 casos; 19.9%). El 57.1% de los pacientes habían sido o eran fumadores. En cuanto al hábito enólico, solamente el 19.9% confirmaron haberlo tenido o tenerlo.

Entre todos los estudiados, el tamaño tumoral más frecuente fue el T4 (59 casos: 37.8%). En cuanto a la afectación ganglionar, el 57.7% (90 pacientes) no presentaban expansión tumoral a nivel cervical. Solamente 2 pacientes presentaban metástasis a distancia (ambas en pulmón) en el momento del diagnóstico inicial (1.3%) frente al resto de 154 pacientes que no presentaban enfermedad a distancia (98.7%).

VARIABLE		N	(%)
T	Tx	2	(1.3)
	T1	24	(14.7)
	T2	51	(32.7)
	T3	21	(13.5)
	T4	59	(37.8)
N	N0	90	(57.7)
	N1	17	(10.9)
	N2	43	(27.6)
	N3	6	(3.8)
M	M0	154	(98.7)
	M1	2	(1.3)
Exitus	sí	49	(31.4)
	no	107	(68.6)

Tabla 12: descripción estadística de la muestra: clasificación TNM y tasa de mortalidad

Durante el período de seguimiento del estudio (24 meses para todos los pacientes) 49 pacientes fallecieron (31.4%) frente a 107 pacientes (68.6%) que seguían los controles en el momento de finalizar el estudio. Por tanto, la supervivencia media a los 24 meses de nuestra muestra es de 21 meses, con un rango de 1 mes a 24 meses y una mediana de 24 meses.

Los resultados inicialmente positivos para PCR VPH y/o p16 se dieron en 29 casos (18.6%), con una discrepancia p16-/PCR+ en 3 casos y p16+/PCR- en 13 casos. Así pues, el estudio de detección de p16 resultó positivo en el 16.7% de la muestra (26 casos). Sin embargo, la detección de VPH mediante PCR fue positiva en el 10.3% (16 casos).

Por esta disparidad, se realizó otro estudio de PCR con más sensibilidad para confirmar los casos discrepantes. Se descartaron los 3 casos p16-/PCR+, ya que con esta prueba resultaron negativos. Finalmente, 130 casos (83.3%) resultaron negativos y 26 casos (16.7%) salieron positivos para VPH mediante detección por p16 y/o PCR, siendo 13 casos p16+/PCR+ (8.3%) y 13 casos p16+/PCR- (8.3%).

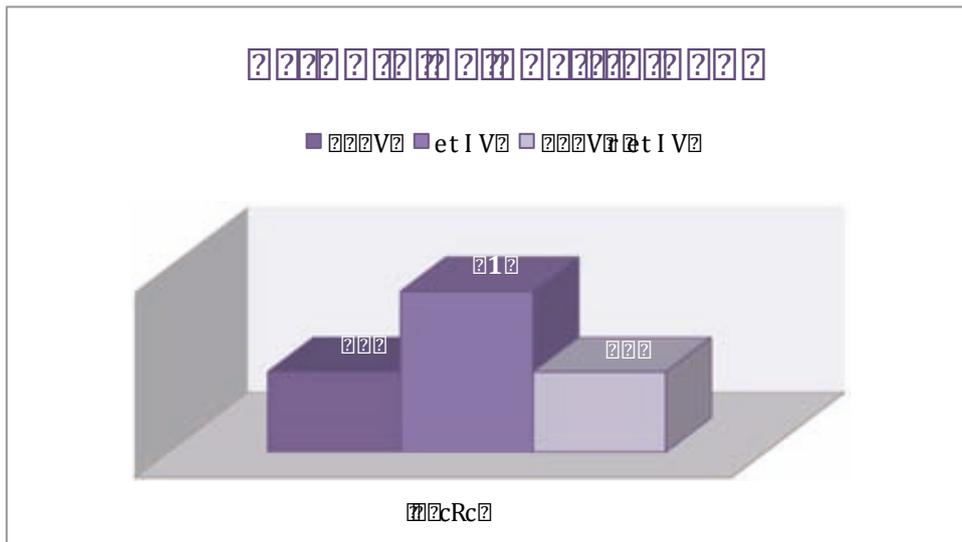


Gráfico estadístico 1: positividad a VPH según prueba realizada: PCR-hibridación y p16

PACIENTE	p16	PCR
7	+	+
10	+	-
18	+	-
19	+	+
29	+	-
36	+	-
39	+	+
60	+	+
64	+	+
68	+	+
69	+	+
72	+	-
75	+	-

PACIENTE	p16	PCR
76	+	+
78	+	-
83	+	-
86	+	-
87	+	-
88	+	+
113	+	+
119	+	-
124	+	+
129	+	-
141	+	-
147	+	+
153	+	+

Tabla 13: detalle de los resultados positivos a VPH según prueba realizada: PCR-hibridación y p16

## ANÁLISIS CON VARIABLE PRINCIPAL “POSITIVIDAD A PCR”

Un total de 13 pacientes (8.3%) presentaron positividad en la detección por PCR.

- ✓ Los genotipos hallados fueron los siguientes: 6, 16, 18, 52, 58, 59 y 83. Algunos de los pacientes presentaban positividad a varios de ellos. El VPH 16 fue el más frecuentemente hallado, en el 69.2% de los casos (solo o combinado con otros genotipos). Podemos observar en la siguiente tabla que existen 2 casos de VPH no considerados como de riesgo oncogénico: pues

ambos (VPH 6 y 83) se acompañaban de la presencia de otros genotipos de VPH de riesgo oncogénico.

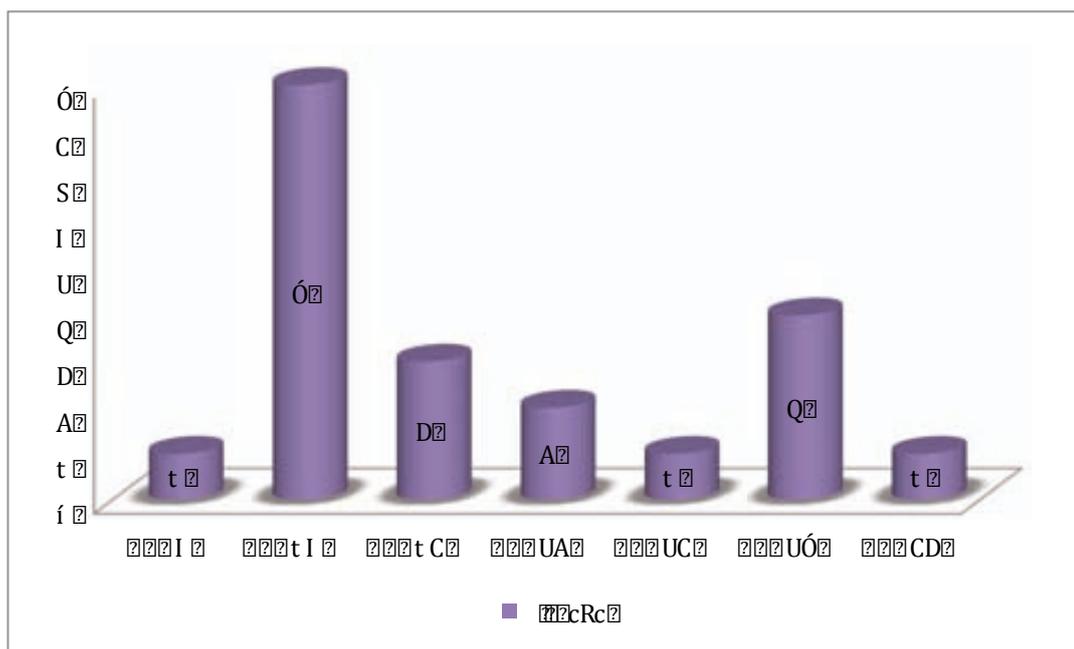


Gráfico estadístico 2: cuantificación de los genotipos de VPH detectados según PCR-hibridación

- ✓ La edad media de los 13 pacientes con VPH+ era de 67.96 años, siendo ésta no estadísticamente diferente a la de los pacientes VPH-, que era de 79.46 años. Por tanto, en nuestra muestra no existe una diferencia significativa en la edad de los pacientes en el diagnóstico inicial ( $p=0.379$ ).
- ✓ La afectación del sexo masculino era mayor en ambos grupos, tanto en los VPH+ (9 hombres: 4 mujeres) como en los VPH- (98 hombres: 45 mujeres), aunque no exista una diferencia estadísticamente significativa.
- ✓ En cuanto a la localización del tumor, en ninguna de ellas ha sido estadísticamente más frecuente hallar VPH+. Sin embargo, en la región de orofaringe es donde la incidencia fue más alta, siendo ésta del 19.4%.

VARIABLE	CATEGORIA	Total	Positividad a PCR			
			Positivo		Negativo	
			n	%	n	%
<b>Sexo</b> p=0.614	mujer	49	4	8.2	45	91.8
	hombre	107	9	8.4	98	91.6
<b>2° Primario</b> P=0.254	sí	15	0	0	15	100
	no	141	13	9.2	128	90.28
<b>Localización</b> P=0.079	lengua	44	2	4.5	42	95.5
	encía /trígono	41	3	7.3	38	92.7
	orofaringe	31	6	19.4	25	80.6
	suelo de boca	12	1	8.3	11	91.7
	mucosa yugal	11	0	0	11	100
	labio	8	0	0	8	100
	paladar	7	0	0	7	100
	desconocido	2	1	50	1	50
<b>Tabaco</b> P=0.294	sí	89	6	6.7	83	93.3
	no	67	7	10.4	60	89.6
<b>Alcohol</b> P=0.225	sí	31	1	3.2	30	96.8
	no	125	12	9.6	113	90.4
<b>T</b> P=0.191	Tx	2	1	50	1	50
	T1	23	2	8.7	21	91.3
	T2	51	3	5.9	48	94.1
	T3	21	3	14.3	18	85.7
	T4	59	4	6.8	55	93.2
<b>N</b> P=0.042	N0	90	6	6.7	84	93.3
	N1	17	0	0	17	100
	N2	43	6	13.9	37	86.1
	N3	6	1	16.7	5	83.3
<b>M</b> P=0.840	M0	154	13	8.4	141	91.6
	M1	2	0	0	2	100
<b>Exitus</b> P=0.17	no	107	10	9.3	97	90.7
	sí	49	3	6.1	46	93.9

Tabla 14: resultados estadísticos del análisis con variable principal "positividad a PCR"

- ✓ En relación a la afectación ganglionar cervical, encontramos una diferencia estadísticamente significativa, siendo más común la afectación N0 o N2 en los VPH+, y con una clara diferencia en la afectación ganglionar N2 respecto a los casos VPH- (p=0.042).
- ✓ La supervivencia a los 24 meses es muy parecida en ambos grupos, siendo de 21.077 meses en los positivos y de 21.007 meses en los negativos (p=0.544).

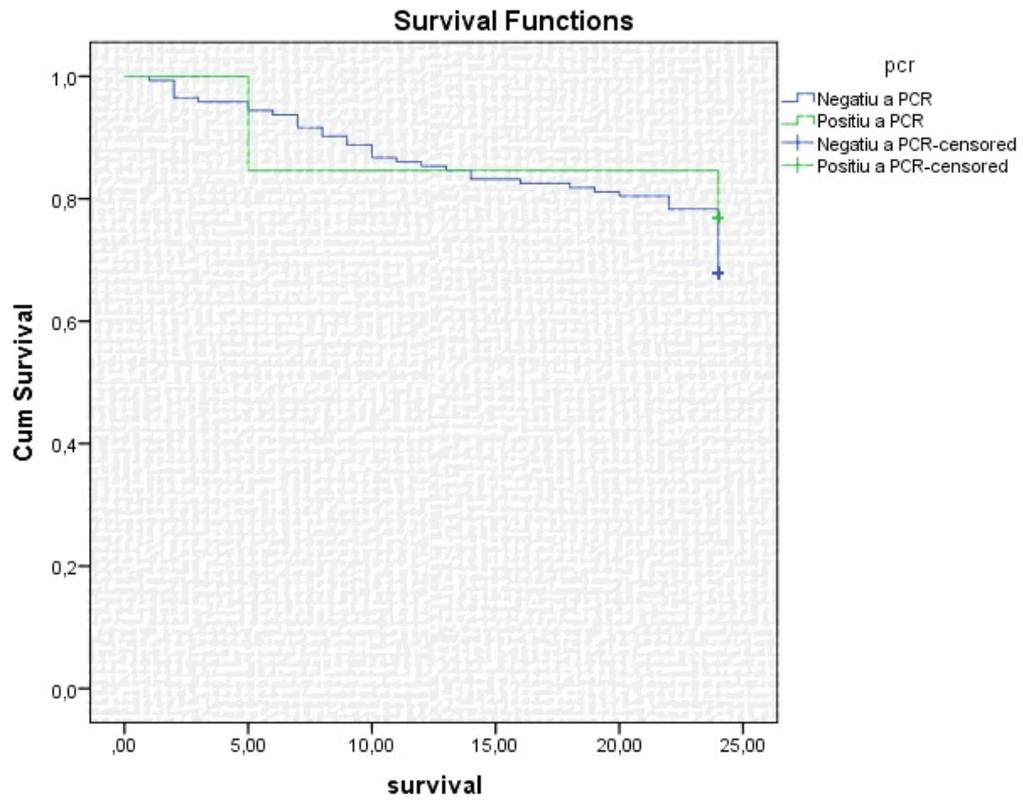


Gráfico estadístico 3: supervivencia a los 24 meses en el análisis con variable principal "positividad a PCR"

## ANÁLISIS CON VARIABLE PRINCIPAL “POSITIVIDAD A p16”

Un total de 26 pacientes (16.7% ) presentaron positividad en la detección del VPH por inmunohistoquímica con p16+. Recordemos que este marcador es el mayor indicador de buen pronóstico. Si realizamos un estudio comparativo de todas las variables estudiadas con relación a la detección de p16, obtenemos los siguientes resultados:

VARIABLE	CATEGORIA	Total	Positividad a p16			
			Positivo		Negativo	
			n	%	n	%
<b>Sexo</b> p=0.431	Mujer	49	9	18.4	40	81.6
	Hombre	107	17	15.9	90	84.1
<b>2° Primario</b> P=0.245	Sí	15	1	6.7	14	93.3
	No	141	25	17.7	116	82.3
<b>Localización</b> P=0.345	lengua	44	5	11.4	39	88.6
	encia /trigono	41	7	17.1	34	82.9
	orofaringe	31	9	29	22	71
	suelo de boca	12	2	16.7	10	83.3
	mucosa yugal	11	1	9.1	10	90.9
	labio	8	1	12.5	7	87.5
	paladar	7	0	0	7	100
	desconocido	2	1	50	1	50
<b>Tabaco</b> P=0.156	sí	89	12	13.5	77	86.5
	no	67	14	20.9	53	79.1
<b>Alcohol</b> P=0.016	sí	31	1	3.2	30	96.8
	no	125	25	20	100	80
<b>T</b> P=0.200	Tx	2	1	50	1	50
	T1	23	5	21.7	18	78.3
	T2	51	5	9.9	46	90.2
	T3	21	6	28.8	15	71.4
	T4	59	9	15.3	50	84.7
<b>N</b> P=0.05	N0	90	15	16.7	75	83.3
	N1	17	1	5.9	16	94.1
	N2	43	9	20.9	34	79.1
	N3	6	1	16.7	5	83.3
<b>M</b> P=0.694	M0	154	26	16.9	128	83.1
	M1	2	1	50	1	50
<b>Exitus</b> P=0.106	no	107	21	19.6	86	80.4
	sí	49	5	10.2	44	89.8

Tabla 15: resultados estadísticos

Resultados estadísticos del análisis con variable principal “positividad a p16”

- ✓ La edad media de los 26 pacientes con p16+ era de 78.27 años, siendo ésta no estadísticamente diferente a la de los pacientes p16-, que era de 78.55 años. Así pues, en nuestra muestra no existe una diferencia significativa en la edad de los pacientes en el momento diagnóstico ( $p=0.379$ ).
- ✓ La afectación del sexo masculino era mayor en ambos grupos, tanto en los p16+ (17 hombres: 9 mujeres) como en los p16- (90 hombres: 40 mujeres), aunque no exista una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.431$ ).
- ✓ En cuanto al abuso de alcohol sí que existía una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos, pues encontramos un 23% de bebedores entre los pacientes p16- frente a un 3.8% de bebedores entre los p16+ ( $p=0.016$ ).
- ✓ En cuanto a la presencia de afectación ganglionar cervical, encontramos una diferencia estadísticamente significativa, siendo más común la afectación N0 y N2 en los p16+, y además la afectación N2 era muy común en p16+ y poco común en los p16- ( $p=0.046$ ).
- ✓ La supervivencia a los 24 meses es algo mayor en los casos positivos a p16 que en los negativos (21.385 y 20.938 meses respectivamente), aunque no sea estadísticamente significativa ( $p=0.186$ ).

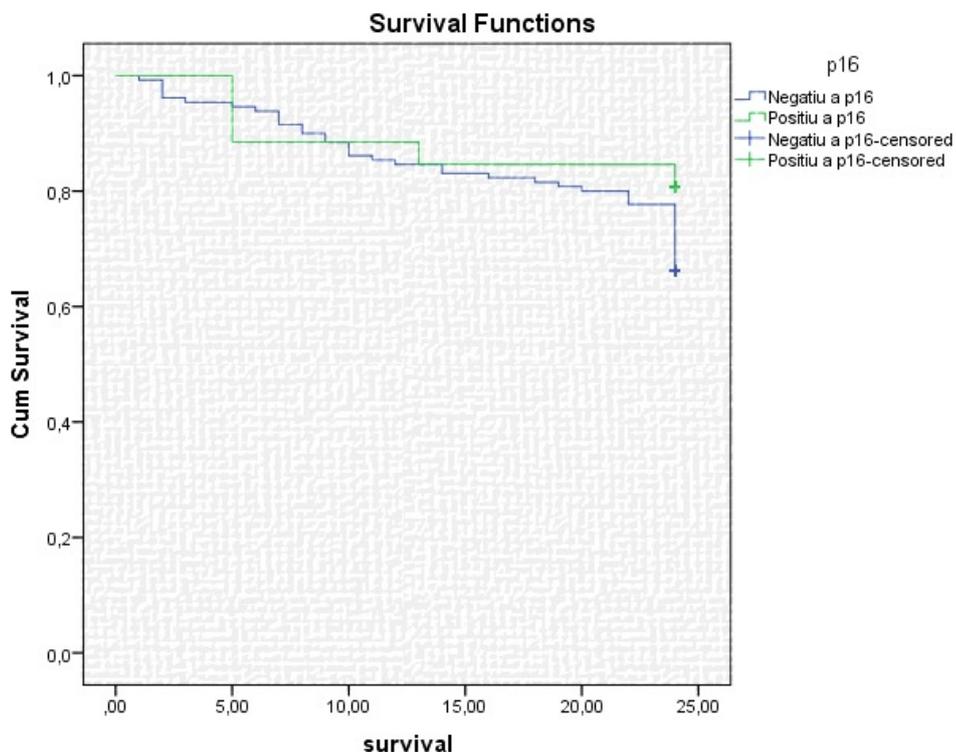


Gráfico estadístico 4: supervivencia a los 24 meses en el análisis con variable principal “positividad a p16”

## ANÁLISIS CON VARIABLE PRINCIPAL “POSITIVIDAD A p16 y PCR”

Un total de 13 pacientes (8.3%) resultaron positivos para las dos técnicas simultáneamente: PCR+ y p16+. En el estudio comparativo obtenemos los siguientes resultados a destacar:

VARIABLE	CATEGORIA	Total	Positividad a PCR y p16				
			Positivo		Negativo		
			n	%	n	%	
<b>Sexo</b> p=0.614	Mujer	49	4	8.2	45	91.8	
	hombre	107	9	8.4	98	91.6	
<b>2º Primario</b> P=0.254	sí	15	0	0	15	100	
	no	141	13	9.2	128	90.28	
<b>Localización</b> P=0.079	lengua	44	2	4.5	42	95.5	
	encia /trigono	41	3	7.3	38	92.7	
	orofaringe	31	6	19.4	25	80.6	
	suelo de boca	12	1	8.3	11	91.7	
	mucosa yugal	11	0	0	11	100	
	labio	8	0	0	8	100	
	paladar	7	0	0	7	100	
	desconocido	2	1	50	1	50	
	<b>Tabaco</b> P=0.294	sí	89	6	6.7	83	93.3
		no	67	7	10.4	60	89.6
<b>Alcohol</b> P=0.225	sí	31	1	3.2	30	96.8	
	no	125	12	9.6	113	90.4	
<b>T</b> P=0.191	Tx	2	1	50	1	50	
	T1	23	2	8.7	21	91.3	
	T2	51	3	5.9	48	94.1	
	T3	21	3	14.3	18	85.7	
	T4	59	4	6.8	55	93.2	
<b>N</b> P=0.042	N0	90	6	6.7	84	93.3	
	N1	17	0	0	17	100	
	N2	43	6	13.9	37	86.1	
	N3	6	1	16.7	5	83.3	
<b>M</b> P=0.840	M0	154	13	8.4	141	91.6	
	M1	2	0	0	2	100	
<b>Exitus</b> P=0.37	no	107	10	9.3	97	90.7	
	sí	49	3	6.1	46	93.9	

Tabla 16:  
resultados

estadísticos del análisis con variable principal "positividad a PCR y p16"

- ✓ En ambos grupos la afectación era mayor en el sexo masculino, tanto en los VPH+ (9 hombres: 4 mujeres) como en los VPH- (98 hombres: 45 mujeres), aunque no exista una diferencia estadísticamente significativa (p=0.614).

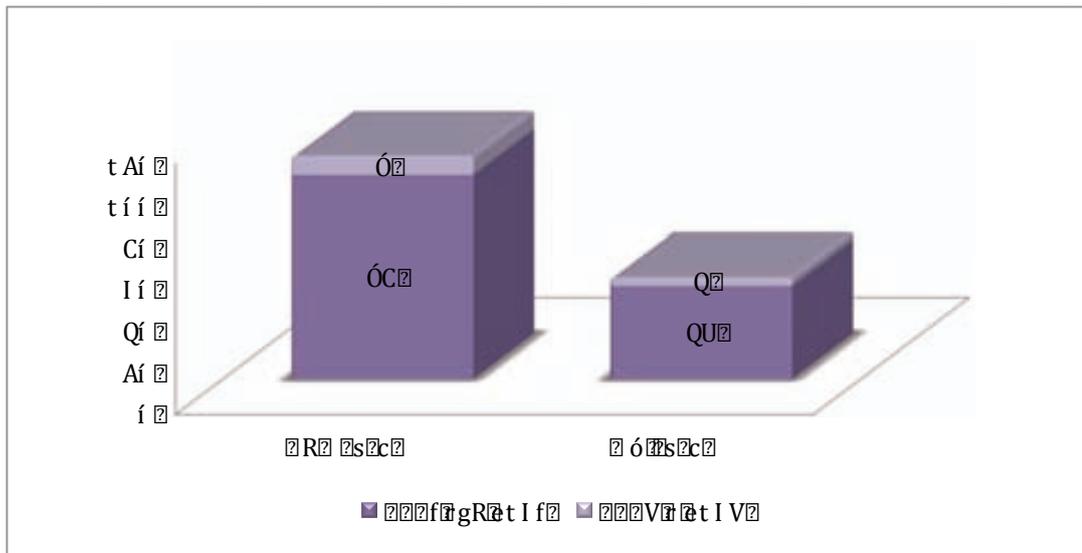


Gráfico estadístico 5: análisis con variable "positividad a PCR y p16" según sexo

- ✓ La edad media de los 13 pacientes con resultados positivos era menor que la de los negativos, aunque tampoco estadísticamente significativa (67.96 y 79.46 años, respectivamente) ( $p=0.379$ ).
- ✓ De los 15 pacientes que se presentaban como un segundo tumor primario, ninguno de ellos era positivo al VPH ( $p=0.254$ ).
- ✓ En cuanto a la localización del tumor, aunque en ninguna localización sea estadísticamente más frecuente hallar VPH+, en la región de orofaringe es donde la incidencia de VPH+ era más alta, siendo ésta del 19.4%. Paralelamente, si consideramos los 13 casos positivos, el 46.15% de ellos son de orofaringe. Además, en los primarios desconocidos, también muy relacionados con el VPH, la incidencia fue del 50% ( $p=0.079$ ).

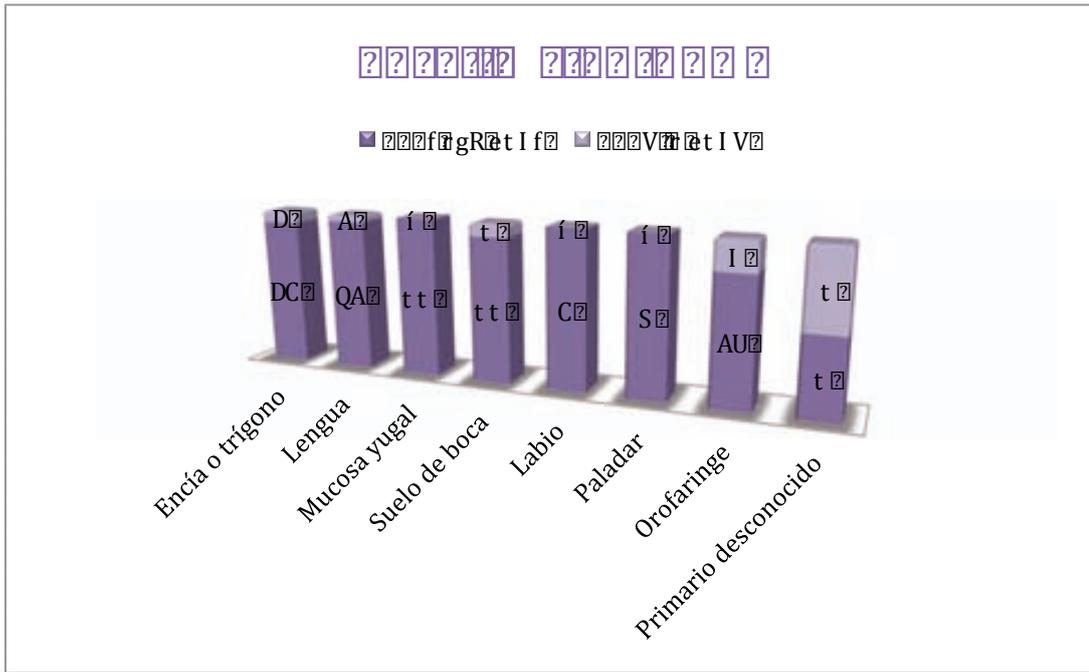


Gráfico estadístico 6: análisis con variable "positividad a PCR y p16" según localización tumoral

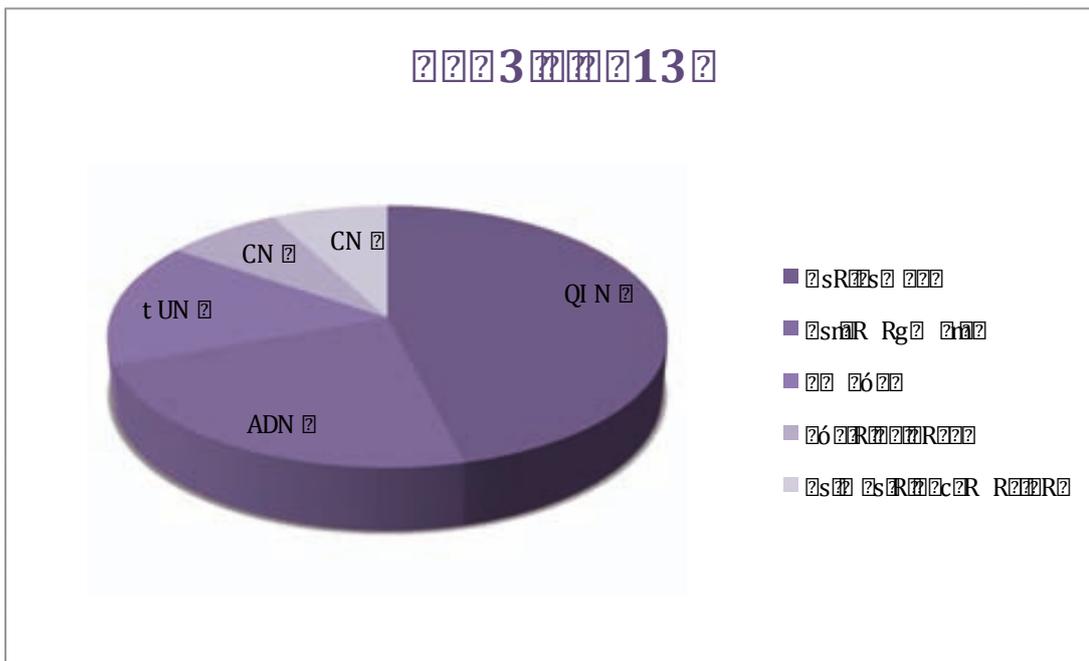


Gráfico estadístico 7: análisis con variable "positividad a PCR y p16" según localización

- ✓ En el hábito tabáquico hallamos una diferencia no estadísticamente significativa, siendo del 58% en los VPH- y del 46% en los VPH+, por lo que no podemos concluir que los pacientes VPH+ sean menos fumadores (p=0.294).

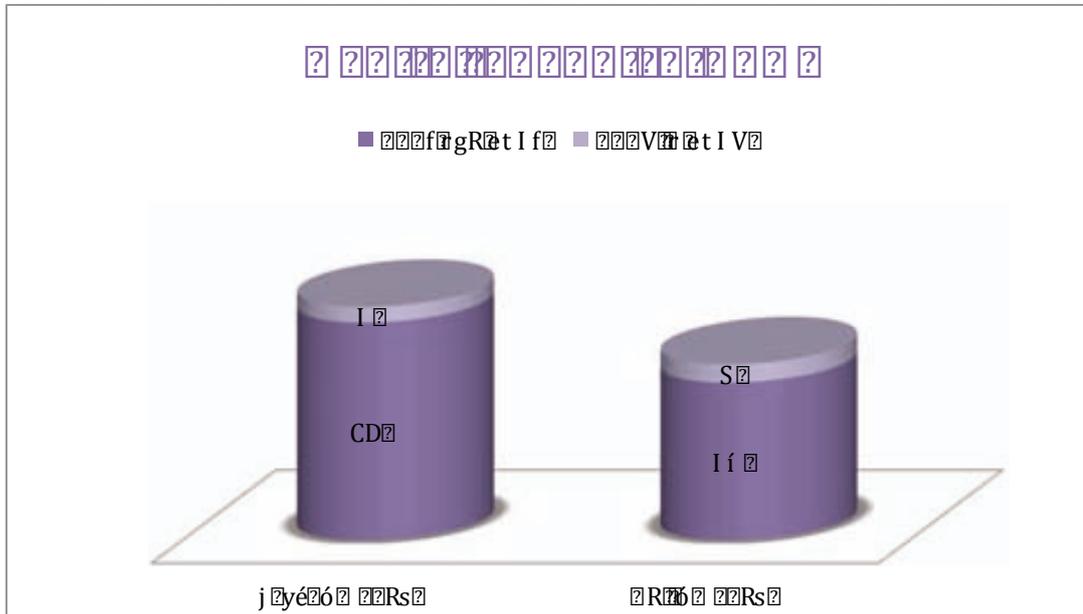


Gráfico estadístico 8: análisis con variable "positividad a PCR y p16" según hábito tabáquico

- ✓ En cuanto al abuso de alcohol también existen diferencias aunque no estadísticamente significativa entre los dos grupos, pues encontramos un 20.9% de bebedores entre los pacientes VPH- frente a un 7.7% de bebedores entre los VPH+ (p=0.225).

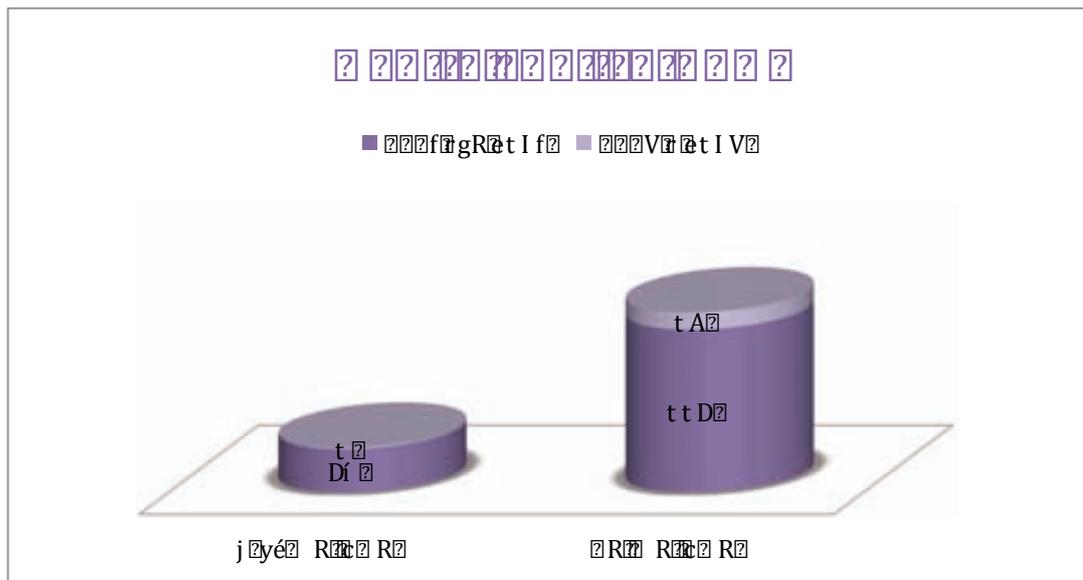


Gráfico estadístico 9: análisis con variable "positividad a PCR y p16" según hábito enólico

- ✓ En cuanto el tamaño tumoral en el momento diagnóstico no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.191$ )

	PCR- y/o p16-	PCR+ y p16+
<b>T (tamaño)</b>		
Tx	1	1
T1	21	2
T2	48	3
T3	18	3
T4	55	4
<b>N (gg cervicales)</b>		
N0	84	6
N1	17	0
N2	37	6(46%)
N3	5	1
<b>M (metástasis)</b>		
M0	141	13
M1	2	0 (0%)

Tabla 17: análisis con variable "positividad a PCR y p16" según estadiaje tumoral TNM

- ✓ En cuanto a la presencia de afectación ganglionar cervical, encontramos una diferencia estadísticamente significativa, siendo más común la afectación N2 en los VPH+, representando el 46% de los casos ( $p=0.042$ ).
- ✓ Las metástasis a distancia son difíciles de estudiar en relación al VPH, ya que solamente en dos pacientes había enfermedad a distancia y ambos eran VPH- ( $p=0.84$ ). Sin embargo, el 0% de las metástasis en los VPH+ es un factor de buen pronóstico.
- ✓ Los pacientes VPH+ tuvieron menos incidencia de éxitus (23%) durante el período del estudio que los VPH- (32.1%), aunque esta diferencia no es significativa estadísticamente ( $p=0.370$ ). La supervivencia a los 24 meses es prácticamente igual y no concluyente estadísticamente, siendo de 21.077 meses de media en los VPH+ y de 21.007 meses de media en los VPH- ( $p=0.544$ ).

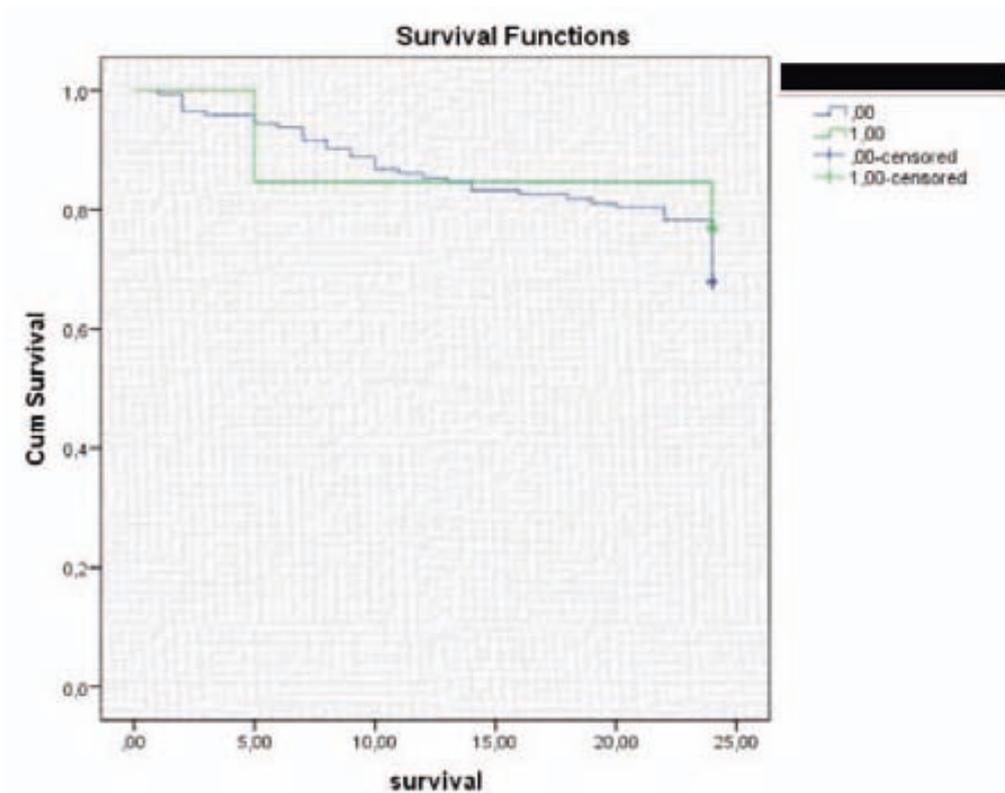


Gráfico estadístico 10: supervivencia a los 24 meses en el análisis con variable principal "positividad a PCR y p16"

## ANÁLISIS DEL SUBGRUPO CCE DE OROFARINGE

Los 31 pacientes con afectación de orofaringe han sido analizados de forma separada. Dentro de esta muestra, la incidencia de positividad para PCR y p16 es del 19.4% (6 casos). A continuación se describe el análisis, aunque los resultados sean a penas significativos debido a la pequeña muestra inicial.

- ✓ La edad media de los pacientes con VPH+ era ligeramente menor que la de los VPH- (65.4 y 72.41 años respectivamente) ( $p=0.136$ ).
- ✓ La incidencia de sexos es la misma en los VPH+ (50% en hombres y 50% en mujeres) ( $p=0.09$ ).
- ✓ De los 2 pacientes que presentaban un segundo tumor primario, ninguno de ellos era VPH+. Así pues, podríamos relacionarlo como un factor de buen pronóstico.
- ✓ El hábito tabáquico es significativamente más común en los VPH- (80%) frente a los VPH+ (50%) ( $p=0.048$ ).
- ✓ No hubo una diferencia estadísticamente significativa en relación al hábito enólico entre los dos grupos, pero encontramos un 28% de bebedores entre los pacientes VPH- frente a un 16.7% de bebedores entre los VPH+ ( $p=0.6$ ).
- ✓ En cuanto el tamaño tumoral en el momento diagnóstico no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p=0.755$ ).
- ✓ Con relación a la presencia de afectación ganglionar cervical, los pacientes VPH+ presentaban más afectación N0 o N2 ( $p=0.807$ ).
- ✓ Las metástasis a distancia no se pueden estudiar en relación al VPH, ya que en ningún paciente había enfermedad a distancia.
- ✓ Los pacientes VPH+ tuvieron menos incidencia de éxitus (16.7%) durante el período del estudio que los VPH- (52%), aunque esta diferencia no es significativa estadísticamente ( $p=0.287$ ).
- ✓ La supervivencia a los 24 meses fue distinta pero no concluyente estadísticamente: 19.28 meses en los VPH+ y 15 meses en los VPH- ( $p=0.732$ ).

## DISCUSIÓN

A partir de los estudios de Syrjänen et al. en 1983, donde relacionaron la infección del VPH con el CCE de múltiples localizaciones, entre ellas la de cabeza y cuello [76], numerosos estudios se han llevado a cabo sobre la infección del VPH y su potencial de cancerización: incidencia, epidemiología, genotipos de riesgo, transmisión y prevención de la infección por VPH, afectación celular y tisular, métodos diagnósticos, alternativas de tratamiento, etc, entre muchos otros campos. El presente trabajo se centra en un estudio sobre una muestra representativa de nuestra población. Debido al pequeño tamaño de la muestra, algunos resultados no son concluyentes. Sin embargo, hemos logrado conseguir nuestro objetivo: estudiar el impacto de la infección por VPH en nuestros pacientes afectos de CECC. Además, la mayoría de nuestros resultados, aunque no estadísticamente significativos, han sido compatibles con los publicados en la literatura. Esto significa que nuestras pruebas diagnósticas han sido válidas, y nos ha permitido establecer un protocolo de detección de VPH en el paciente con CECC.

### DESCRIPCIÓN DE GRUPOS

El estudio de detección de p16 resultó positivo en el 16.7% de la muestra (26 casos). Sin embargo, la detección de VPH mediante PCR fue positiva en la mitad de ellos: el 8.3% (13 casos). Las disparidades p16+ y VPH- pueden ser debidas a que nuestra PCR/hibridación no detecte determinado genotipo de VPH, a que el marcaje de células p16+ no esté relacionado con el VPH (en los que podríamos considerar realizar la hibridación para virus Epstein-Barr, por ejemplo), o a que la sobreexpresión de p16 se encuentre relacionada con otras condiciones como la senescencia, donde la actividad viral se encuentra en estado latente. No podemos descartar tampoco el hecho de que al tratarse de un estudio retrospectivo, la antigüedad de las muestras histológicas interfiera en la detección mediante PCR del VPH. De todos modos, en cada prueba fue realizado el control de calidad de PCR de actina (217 pb).

Actualmente, las técnicas aprobadas por la FDA son las de detección del ADN del VPH, aunque se haya demostrado que la detección de p16 presenta más relación con el pronóstico de la enfermedad tumoral [119]. Por esta razón, al realizar el análisis comparativo tomamos como referencia el grupo VPH+, considerando que es positivo en ambas pruebas diagnósticas: PCR-hibridación *in situ* y p16.

Remarcamos también algunos resultados del grupo p16+ relevantes, como aquellos relacionados con la supervivencia.

## ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Nuestro estudio incluye una muestra de 156 pacientes diagnosticados y tratados en el Hospital Vall d'Hebron de CCE de cavidad oral, faringe o con metástasis ganglionares cervicales y tumor primario desconocido. A continuación comparamos nuestros resultados con aquellos publicados en la literatura.

La incidencia de cada localización no se puede extrapolar a la población general, ya que, por ejemplo, los tumores de labio o los tumores de estadio precoz en ocasiones son tratados en otros centros de menor nivel oncológico.

Actualmente, la literatura estima que un 15-20% de los CECC son VPH+ y que específicamente el 20-80% de los tumores de orofaringe son positivos, dependiendo del área geográfica [2,3,72,95,107,117,118]. Sin embargo, en nuestra muestra el VPH no tiene un impacto tan importante como consta en la literatura. En cavidad oral hemos obtenido un 8.3% de positivos en relación al 15-20% reportado en la literatura, y en orofaringe un 19.4% en relación al 20-80% descrito en la literatura. La razón de que en nuestra muestra el VPH no tenga un impacto tan importante como consta en la literatura (en cavidad oral del 8.3% en relación al 15-20% según la literatura y en orofaringe del 19.4% en relación al 50-80% reportado en la literatura) puede deberse bien a que en nuestra población el hábito tabáquico y enólico son muy prevalentes [1], bien a que la incidencia de VPH en nuestra población sea menor, o bien porque nuestra muestra no resulta lo suficientemente representativa. Pero si seleccionamos los 26 pacientes p16+ (que representan el 16.7% de todos nuestros CECC y el 29% de los de orofaringe), el porcentaje está dentro del intervalo reportado por la literatura.

Es interesante destacar que hemos obtenido resultados positivos para el VPH en varias de las localizaciones estudiadas: orofaringe, trígono retromolar o encía, lengua y suelo de boca. A pesar de que en nuestro estudio la orofaringe ha sido la localización con más resultados positivos (46.15% de todos los positivos), seguida de trígono retromolar (23%), ni en éstas ni en el resto de localizaciones ha sido estadísticamente significativa la presencia de casos positivos ( $p=0.079$ ).

A fecha de hoy se han descrito más de 100 tipos de VPH. De todos los genotipos de alto riesgo, el 16 es el más relacionado con el CECC seguido del 18, según la literatura [95,117,118]. En la mayoría de los casos VPH+, fueron detectados más de un genotipo de VPH. De nuestros 13 resultados PCR+, la detección de VPH 16 ha

sido significativamente mayor (69.2%), seguido de otros genotipos como VPH 59 (30.7%) y 18 (23%).

La transmisión del virus a través del sexo oro-genital determina que su práctica y el elevado número de compañeros sexuales sean, por consiguiente, los desencadenantes directos de este tipo de tumores [102,149]. La literatura indica la necesidad de dedicar una parte de la anamnesis a preguntar sobre relaciones sexuales de riesgo, así como añadir en las charlas de educación sexual los riesgos de transmisión de infecciones con riesgo oncogénico en la práctica del sexo oro-genital. En nuestro estudio, al ser retrospectivo, no hemos podido incluir ningún cuestionario de salud sexual para valorarlo.

En cambio, sí que hemos estudiado la presencia de los hábitos tóxicos más relacionados con el CECC. En nuestra muestra el tabaquismo fue más frecuente en los pacientes VPH- que en los VPH+, pero no resultó estadísticamente significativo (58% y 46% respectivamente,  $p=0.294$ ). En cuanto al abuso de alcohol, a pesar de que éste era menos frecuente en los VPH+, el análisis no resultó estadísticamente significativo para el grupo PCR+/p16+ (7.7% frente al 20.9%,  $p=0.225$ ); aunque sí resultó estadísticamente significativo para el grupo de pacientes p16+ (3.8% frente al 23%,  $p=0.016$ ). En este caso, nuestros resultados concuerdan con los publicados en la literatura [83,142].

En cuanto a la edad en el momento del diagnóstico, hemos detectado una discreta disminución en el grupo VPH+ respecto al VPH- (67.96 y 79.46 años respectivamente), aunque no estadísticamente significativa ( $p=0.379$ ). La mayoría de artículos destacan una edad menos avanzada en el grupo VPH+ [83,147]. Esta diferencia de edad se cree que está relacionada con el menor tiempo necesario para producir cancerización del tejido infectado por VPH comparado con los factores irritantes del tabaco y el alcohol [86,87].

Nuestros resultados detectan que el sexo masculino resulta más comúnmente afectado, tanto para los tumores VPH+ (9 hombres: 4 mujeres), como para los VPH- (98 hombres: 45 mujeres), pero tampoco son datos estadísticamente significativos ( $p=0.614$ ). Igualmente, la literatura refleja mayor afectación en el sexo masculino en ambos grupos [95,148].

Múltiples estudios han demostrado que los CCE de orofaringe VPH+ tienen más probabilidad de presentarse con un estadio más temprano del primario (T1/T2), pero también más frecuentemente se halla una afectación ganglionar cervical más avanzada (N2/N3). Un estudio reciente ha sugerido que los tumores VPH 16+ tienen más tendencia a presentar afectación ganglionar que el resto de virus de alto riesgo [151]. Sin embargo, las metástasis a distancia suelen ser menos frecuentes en los casos VPH+ [152], al igual que los segundos tumores primarios [153].

En nuestro estudio, en el estadiaje TNM, no hallamos diferencias en cuanto al tamaño tumoral (T) ( $p=0.191$ ) o a las metástasis a distancia (M) ( $p=0.84$ ), pero sí en la afectación ganglionar cervical (N): en los pacientes VPH+ destacamos mayor afectación ganglionar cervical N2, representando el 46% de los casos ( $p=0.042$ ).

Resulta interesante subrayar que el número de casos T4 aumenta sobre todo a raíz de los tumores de encía o trígono retromolar (de 28 tumores en esta localización, el 47.5% son T4). Esto es debido a que según las normas de estadiaje TNM, cuando hay afectación ósea ya se considera T4.

En el estudio de Zhang [51] hallaron que en un 30% de los pacientes con metástasis cervical de origen desconocido con PAAF positiva a CCE VPH+ había un primario de amígdala homolateral y en un 10% el primario se encontraba en la amígdala contralateral. Las metástasis cervicales VPH+ han sido identificadas no solamente por la detección de VPH y la inmunoreactividad de p16, sino que además se ha correlacionado con una morfología histológica desqueratinizante distinta. Así pues, en caso de detectar metástasis cervicales de origen desconocido con PAAF positiva a CCE y VPH+, la primera opción a descartar es el origen amigdalario. Nuestra muestra incluye 2 pacientes con tumores primarios desconocidos, con una incidencia de VPH+ del 50% (uno de los casos es VPH+). En ambos casos se descartó que el primario estuviera en amígdalas, y solamente en el caso positivo resultó estar afectada.

Los datos de supervivencia a corto plazo (24 meses) son similares cuando comparamos ambos grupos, siendo de 21.077 meses de media en los VPH+ y de 21.007 meses de media en los VPH- ( $p=0.544$ ). Los pacientes VPH+ tuvieron menos incidencia de éxitus (23%) durante el período del estudio que los VPH- (32.1%), aunque esta diferencia no sea estadísticamente significativa ( $p=0.370$ ). Pero es relevante que el grupo p16+, considerado marcador de buen pronóstico, es el que presenta comparativamente mejores resultados de buen pronóstico: alta supervivencia a los 24 meses (21.385 y 20.938 meses respectivamente,  $p=0.186$ ) y baja tasa de éxitus (19% y 33.8% respectivamente,  $p=0.106$ ). Sin embargo, sería preciso hacer un seguimiento de los pacientes de al menos 5 años para obtener datos más concluyentes. La literatura revisada relata que, al margen de presentar mejor pronóstico, los pacientes VPH+ responden mejor al tratamiento, ya sea con cirugía, RT o QT, y presentan menor tasa de recidiva [122,124,146,158,159]. De hecho, los estudios concluyen que los pacientes con CECC VPH+ tienen un riesgo de morir por causa tumoral un 60-80% menor que los pacientes VPH- [81]. Actualmente numerosos estudios sobre marcadores tumorales se están llevando a cabo para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad oncológica.

Debemos destacar que en nuestro estudio hemos aplicado el mismo tratamiento en todos los pacientes. No hemos tenido en cuenta la hipótesis de que los pacientes

VPH tienen un mejor pronóstico que los VPH-, y quizás puedan beneficiarse de un tratamiento menos agresivo, ya que por el momento no hay ninguna pauta de tratamiento aprobada que garantice las mismas tasas de supervivencia [43,163-165].

Como según la literatura los tumores VPH+ se hallan sobre todo en orofaringe, hemos llevado a cabo un subestudio específico para los tumores localizados en esta región. Aunque podamos obtener datos de predominio de incidencias, desafortunadamente nuestra muestra es demasiado pequeña (n=31 casos de CCE de orofaringe) para alcanzar conclusiones estadísticamente significativas. Hemos obtenido 6 casos positivos a PCR y p16 (19.4%), de los cuales la mitad eran hombres (50% hombres y 50% mujeres) (p=0.09). Sin embargo, el grupo de pacientes positivos eran ligeramente más jóvenes (65.4 y 72.41 años respectivamente) (p=0.136); el hábito tabáquico resultó más habitual en los VPH- (80%) que en los VPH+ (50%) (p=0.048); encontramos un 28% de bebedores entre los pacientes VPH- frente a un 16.7% de bebedores entre los VPH+ (p=0.6); no hallamos diferencias en cuanto al tamaño tumoral (T) (p=0.755) o a las metástasis a distancia (M) (ningún paciente con metástasis a distancia), pero sí en la afectación ganglionar cervical (N): los pacientes VPH+ presentaban más afectación N0 o N2 (p=0.807); los pacientes VPH+ tuvieron menos incidencia de éxitus (16.7%) durante el período del estudio que los VPH- (52%) (p=0.287) y la supervivencia a los 24 meses también fue ligeramente distinta (19.28 meses en los VPH+ y 15 meses en los VPH-) (p=0.732).

## APLICACIONES DEL ESTUDIO A LA PRÁCTICA CLÍNICA

A partir de nuestra experiencia y de la revisión de datos, creemos que no es necesario realizar pruebas de detección de VPH a todos los pacientes con CECC. Se trata de pruebas no invasivas, pero caras de llevar a cabo, siendo los precios de 50€ la p16 y de 30€ la PCR-hibridación in situ.

Para detectar la presencia del VPH en los CECC, la tinción de p16 es más sensible como detección primaria y además es un buen marcador pronóstico, por lo que esta técnica puede realizarse en primera instancia a toda la población con CCE de orofaringe. También recomendamos hacerla en los pacientes con CECC con características citopáticas sugestivas de infección VPH (escasa queratinización y características basaloides, núcleos irregulares con coilocitos y binucleaciones e infiltración de linfocitos en el estroma y en los nidos tumorales) o con características epidemiológicas sospechosas (paciente joven y/o sin hábitos tóxicos de riesgo).

Para corroborar la presencia de VPH y estudiar su genotipo, se puede llevar a cabo una PCR-hibridación *in situ* en aquellos pacientes p16+, que es una prueba más específica [119,120,122-124]. Otro buen marcador aún en fase de estudio, a parte de la detección de p16, son los niveles de anticuerpos en sangre contra las proteínas E<sub>6</sub> y E<sub>7</sub> del VPH [121].

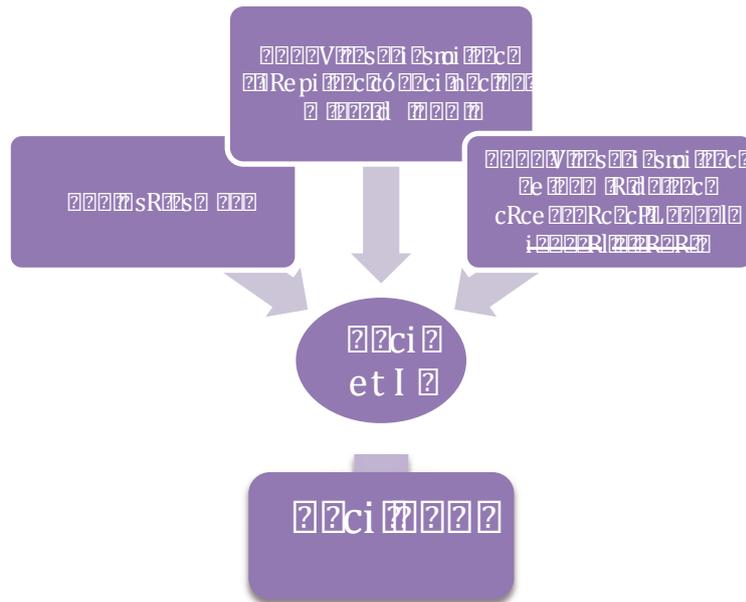


Imagen 51: algoritmo de detección de VPH en los pacientes con CECC

## MIRANDO AL FUTURO ¿QUÉ ESTUDIOS PUEDEN DERIVAR DE ESTE TRABAJO?

Éste es un estudio retrospectivo de la relación del VPH con los CECC. Hemos demostrado que el VPH asienta con mayor predominio en orofaringe, por lo que sería prometedor realizar un estudio prospectivo en un grupo específico de pacientes con carcinomas de orofaringe.

También hemos estudiado la evolución de estos pacientes durante un corto período de tiempo (24 meses). Sería interesante alargar el tiempo de estudio al menos hasta los 5 años para obtener resultados de supervivencia y pronóstico de enfermedad más significativos. Además, tal y como se ha postulado, los pacientes con algún CCE VPH+ tienen más riesgo que el resto de la población de tener otro tumor relacionado con el VPH en otra localización distinta, así que sugerimos el

seguimiento de los pacientes VPH+ para analizar la correlación con otros tumores VPH+.

Además, habiendo observado el distinto comportamiento epidemiológico y clínico de este subgrupo de pacientes, habría que estudiar la posibilidad de aplicar pautas de tratamiento menos agresivas e igualmente efectivas para disminuir la morbilidad asociada al tratamiento. Sin embargo, quizás podríamos evitar la existencia de este tipo de tumores asociados al VPH con la vacunación poblacional contra el VPH. Esta podría ser otra línea de investigación prometedora.

Finalmente, tal y como Nakahira et al. [125] publican en su trabajo, sugerimos estudiar el uso de la técnica de difusión por resonancia magnética para detectar aquellos CECC VPH+, al igual que la detección del ARN de las oncoproteínas E6 y E7.

## CONCLUSIONES

1. En nuestro estudio demostramos la presencia de VPH en algunos de los pacientes con CECC mediante pruebas histológicas, tinción inmunohistoquímica de p16 y técnica de PCR-hibridación *in situ*.
2. El VPH en cavidad oral es poco frecuente (8.4%), aunque sí que existe gran afinidad del VPH por la orofaringe. En nuestra muestra la localización más común de VPH es en orofaringe (46.15%), seguida del triángulo retromolar (23%).
3. Al comparar los dos grupos de pacientes VPH+ y VPH-, hallamos ciertas diferencias en cuanto a la presentación y evolución clínicas de los pacientes:
  - a. Edad: el grupo VPH+ son más jóvenes que el VPH- (67.96 y 79.46 años respectivamente,  $p=0.379$ ).
  - b. Sexo: en ambos grupos predomina el sexo masculino, tanto en los VPH+ (9 hombres: 4 mujeres) como en los VPH- (98 hombres: 45 mujeres) ( $p=0.614$ ).
  - c. Incidencia de hábito tabáquico: los pacientes VPH+ son menos frecuentemente fumadores que los VPH- (58% y 46% respectivamente,  $p=0.294$ ).
  - d. Incidencia de abuso de alcohol: los pacientes positivos son menos frecuentemente bebedores que los VPH- (7.7% frente al 20.9%,  $p=0.225$ ).
  - e. Estadaje TNM: no hallamos diferencias en cuanto al tamaño tumoral (T) ( $p=0.191$ ) o a las metástasis a distancia (M) ( $p=0.84$ ), pero sí en la afectación ganglionar cervical (N): en los pacientes VPH+ destacamos mayor afectación ganglionar cervical N2, representando el 46% de los casos ( $p=0.042$ ).
  - f. La supervivencia a corto plazo (24 meses) es algo mayor en los casos positivos a p16 que en los negativos (21.385 y 20.938 meses respectivamente,  $p=0.186$ ), y la tasa de éxitus es menor en los p16+ (19% y 33.8% respectivamente,  $p=0.106$ ).
4. Como técnica de detección del VPH en CECC, en nuestro estudio la tinción de p16 es más sensible, por lo que esta técnica puede realizarse en primera instancia a toda la población con CCE de orofaringe y a los pacientes con CECC con características epidemiológicas o con cambios citopáticos sugestivos de infección por VPH. Como detección más específica y para conocer la presencia y tipo de VPH se puede llevar a cabo una PCR y/o hibridación *in situ* en aquellos pacientes p16+.

## CONCLUSIONS: European Certificate

1. In our study we have demonstrated the presence of HPV in some patients diagnosed with HNSCC by the following techniques: histological testing using hematoxylin eosin staining, immunohistochemical staining of p16 and PCR - in situ hybridization.
2. HPV in oral cavity is rare (8.4%), although it has a strong affinity for the oropharyngeal region. In our sample, the most common site of HPV detection is the oropharynx (46.15%), followed by the retromolar area (23%).
3. When comparing both groups, + HPV and - HPV patients, we found some differences:
  - a. Age: + HPV group are younger than - HPV (67.96 and 79.46 years old respectively,  $p=0.379$ ).
  - b. Sex: male affectation predominates in both groups: + HPV (9 men, 4 women) and - HPV (98 men, 45 women) ( $p=0.614$ ).
  - c. Smoking incidence: + HPV are lightert smokers than - HPV patients (58% and 46% respectively,  $p=0.294$ ).
  - d. Alcohol abuse incidence: positive patients are lighter drinkers than the negative ones (7.7% vs 20.9%,  $p=0.225$ ).
  - e. TNM staging: we found no differences in tumour size (T) ( $p=0.191$ ) or distant metastases (M) ( $p=0.84$ ), but in the cervical lymph node (N) we found a higher stage in + HPV patients, the stage being N2 in 46% of the cases ( $p=0.042$ ).
  - f. The short-term survival (24 months) is slightly higher in p16 positive cases than in the negative ones (21.385 and 20.938 months respectively,  $p=0.186$ ), and the exitus rate is lower in + p16 (19% vs 33.8%,  $p=0.106$ ).
4. Regarding the HPV detection technique in HNSCC, p16 staining is more sensitive, so it's recommended as primary screening. This test can be performed initially to the whole population with oropharyngeal SCC and patients diagnosed with HNSCC having epidemiological or cytopathic changes, which suggests HPV infection. In the + p16 patients, PCR and / or in situ hybridization will confirm the infection and detect the HPV type.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Fernández E, Schiaffino A, García M, Saltó E, Villalbí JR, Borràs JM. Smoking in Spain, 1945-1995. A retrospective analysis based on the Spanish National Health Interview Surveys. *Med Clin (Barc)*. 2003; 18;120(1):14-6.
2. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*. 2008; 1;26(4):612-9.
3. 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; 1;129(3):733-41.
4. O'Rorke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol*. 2012; 48(12):1191-201.
5. Ang KK, Sturgis EM. Human papillomavirus as a marker of the natural history and response to therapy of head and neck squamous cell carcinoma. *Semin Radiat Oncol*. 2012; 22: 128-42.
6. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*. 1999; 49:33.
7. Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res*. 1998; 18:4779.
8. Oral Cancer Incidence (New Cases) by Age, Race, and Gender. National Institute of Dental and Craniofacial Research (NIDCR). National Institute of Health. March 2010.
9. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013; 63:11.
10. DeSantis C, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics for African Americans, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013; 63:151.
11. Settle K, Posner MR, Schumaker LM, Tan M, Suntharalingam M, Goloubeva O, Strome SE, Haddad RI, Patel SS, Cambell EV 3rd, Sarlis N, Lorch J, Cullen KJ. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2009; 2:776.

12. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988; 48:3282.
13. Andre, K, Schraub, S, Mercier, M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: A case-control study in the Doubs region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995; 31B: 301.
14. Spitz, MR. Epidemiology and risk factors for head and neck cancer. *Semin Oncol.* 1994; 21:281.
15. Lewin, F, Norell, SE, Johansson, H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biörklund A, Rutqvist LE. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer.* 1998; 82:1367.
16. Tan, EH, Adelstein, DJ, Droughton, ML, Van Kirk MA, Lavertu P. Squamous cell head and neck cancer in nonsmokers. *Am J Clin Oncol.* 1997; 20:146.
17. Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, Franke GE, Pauly JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006; 15:1061.
18. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J, Eluf-Neto J, Olshan AF, Rudnai P, Schwartz SM, Smith E, Sturgis EM, Szeszenia-Dabrowska N, Talamini R, Wei Q, Winn DM, Zaridze D, Zatonski W, Zhang ZF, Berthiller J, Boffetta P. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007; 99:777.
19. Druesne-Pecollo, N, Tehard, B, Mallet, Y, Gerber M, Norat T, Hercberg S, Latino-Martel P. Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. *Lancet Oncol.* 2009; 10:173.
20. Jeng, JH, Chang, MC, Hahn, LJ. Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. *Oral Oncol.* 2001; 37:477.
21. Flaitz, CM, Hicks, MJ. Molecular piracy: The viral link to carcinogenesis. *Oral Oncol.* 1998; 34:448.
22. Das CM, Schantz SP, Shillitoe EJ. Antibody to a mutagenic peptide of herpes simplex virus in young adult patients with cancer of the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 75:610.

23. Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, Westra WH, Cohen Y, Koch WM, Sidransky D, Califano JA. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope* 2004; 114:1027.
24. Becher H, Ramroth H, Ahrens W, Risch A, Schmezer P, Dietz A. Occupation, exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and laryngeal cancer risk. *Int J Cancer*. 2005; 116:451.
25. van der Laan BF, Baris G, Gregor RT, Hilgers FJ, Balm AJ. Radiation- induced tumours of the head and neck. *J Laryngol Otol*. 1995; 109:346.
26. Boeing H, Dietrich T, Hoffmann K, Pischon T, Ferrari P, Lahmann PH, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F, Allen N, Key T, Skeie G, Lund E, Olsen A, Tjonneland A, Overvad K, Jensen MK, Rohrmann S, Linseisen J, Trichopoulou A, Bamia C, Psaltopoulou T, Weinehall L, Johansson I, Sánchez MJ, Jakszyn P, Ardanaz E, Amiano P, Chirlaque MD, Quirós JR, Wirfalt E, Berglund G, Peeters PH, van Gils CH, Bueno-de-Mesquita HB, Büchner FL, Berrino F, Palli D, Sacerdote C, Tumino R, Panico S, Bingham S, Khaw KT, Slimani N, Norat T, Jenab M, Riboli E Intake of fruits and vegetables and risk of cancer of the upper aero-digestive tract: the prospective EPIC-study. *Cancer Causes Control*. 2006; 17:957.
27. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Waal I, Snow GB. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995; 121:157.
28. Bongers, V, Braakhuis, BJ, Tobi, H, Lubsen H, Snow GB. The relation between cancer incidence among relatives and the occurrence of multiple primary carcinomas following head and neck cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996; 5:595.
29. Silverman, S Jr, Gorsky, M, Lozada, F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984; 53:563.
30. Hansen LS, Olson JA, Silverman S Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985; 60:285.
31. Edge, SB, Byrd, DR, Compton, CC, et al (Eds). *AJCC (American Joint Committee on Cancer) Cancer Staging Manual*, 7th ed, Springer, New York, 2010.
32. *NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines)*. Version 2. 2013.
33. Pignon JP, le Maître A, Maillard E, Bourhis J, MACH-NC Collaborative Group. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiother Oncol*. 2009; 92:4.
34. Loree TR, Strong EW. Significance of positive margins in oral cavity squamous carcinoma. *Am J Surg*. 1990; 160(4):410-4.

35. Ravasz LA, Slootweg PJ, Hordijk GJ, Smit F, van der Tweell. The status of the resection margin as a prognostic factor in the treatment of head and neck carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg.* 1991; 19(7):314-8.
36. Patel SG, Shah JP. Tumors of the Oropharynx. En: Shah JP, editor. *Cancer of the Head and Neck.* Atlanta, GA: American Cancer Society. BC Decker Inc; 2001. p.127-45.
37. Dicker A, Harrison LB, Picken CA, Sessions RB, O'Malley BB. Oropharyngeal cancer. En: Harrison LB, Sessions RB, Hong WK, editors. *Oropharyngeal cancer.* Philadelphia: Lippincott/Raven; 1999. p.445-80.
38. Vandebrouck C, Sancho-Garnier H, Chassagne D, Saravane D, Cachin Y, Micheau C. Elective versus therapeutic radical neck dissection in epidermoid carcinoma of the oral cavity: results of a randomized clinical trial. *Cancer.* 1980; 46(2):386-90.
39. Thompson CF, St John MA, Lawson G, Grogan T, Elashoff D, Mendelsohn AH. Diagnostic value of sentinel lymph node biopsy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2013 Jul;270(7):2115-22.
40. Mancuso AA. The "third-best" strategy for treating head and neck cancer. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1999; 20(7):1191-2.
41. Mukherji SK, Wolf GT. Evaluation of head and neck squamous cell carcinoma after treatment. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003; 24(9):1743-6.
42. Hudgins PA, Burson JG, Gussack GS, Grist WJ. CT and MR appearance of recurrent malignant head and neck neoplasms after resection and flap reconstruction. *AJNR Am J Neuroradiol.* 1994;15(9):1689-94.
43. Wester DJ, Whiteman ML, Singer S, Bowen BC, Goodwin WJ. Imaging of the postoperative neck with emphasis on surgical flaps and their complications. *AJR Am J Roentgenol.* 1995; 164(4):989-93.
44. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, Jiang B, Goodman MT, Sibug-Saber M, Cozen W, Liu L, Lynch CF, Wentzensen N, Jordan RC, Altekruse S, Anderson WF, Rosenberg PS, Gillison ML. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 2011; 29:4294–301.
45. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global Cancer Statistics, 2002.* *CA Cancer J Clin.* 2005; 55:74.
46. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Human papillomavirus-associated cancers – United States, 2004-2008. *MMWR Morbidity and mortality weekly report.* 2012; vol. 61. p. 258–61.

47. Sturgis EM, Ang KK. The epidemic of HPV-associated oropharyngeal cancer is here: is it time to change our treatment paradigms? *J Natl Compr Canc Netw*. 2011; 9:665.
48. Lindberg R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer*. 1972; 29(6):1446-9.
49. Candela FC, Kothari K, Shah JP. Patterns of cervical node metastases from squamous carcinoma of the oropharynx and hypopharynx. *Head Neck*. 1990; 12(3):197-203.
50. Cerezo L, Millán I, Torre A, Aragón G, Otero J. Prognostic factors for survival and tumor control in cervical lymph node metastases from head and neck cancer. A multivariate study of 492 cases. *Cancer*. 1992; 69(5):1224-34.
51. Zhang MQ, El-Mofty SK, Dávila RM. Detection of Human Papillomavirus-related Squamous Cell Carcinoma Cytologically and by In Situ Hybridization in Fine-needle Aspiration Biopsies of Cervical Metastasis. *Cancer*. 2008; 25;114(2):118-23.
52. OncoGuía de orofaringe. Barcelona: Agència d'Avaluació de Tecnologia i Recerca Mèdiques. CatSalut. Departament de Salut. Generalitat de Catalunya. Novembre 2004 (OG04/2004)
53. Traynor SJ, Cohen JI, Gray J, Andersen PE, Everts EC. Selective neck dissection and the management of the node-positive neck. *Am J Surg*. 1996; 172(6):654-7.
54. Lewin F, Damber L, Jonsson H, Andersson T, Berthelsen A, Biörklund A, Blomqvist E, Evensen JF, Hansen HS, Hansen O, Jetlund O, Mercke C, Modig H, Overgaard M, Rosengren B, Tausjö J, Ringborg U. Neoadjuvant chemotherapy with cisplatin and 5-fluorouracil in advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase III study. *Radiother Oncol*. 1997; 43(1):23-8.
55. Domette C, Hill C, Lefebvre JL, De Raucourt D, Rhein B, Wibault P, Marandas P, Coche-Dequeant B, Stromboni-Lubinski M, Sancho-Garnier H, Lubinski B; French Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête et du Cou (GETTEC). Randomized trial of neoadjuvant chemotherapy in oropharyngeal carcinoma. French Groupe d'Etude des Tumeurs de la Tête et du Cou (GETTEC). *Br J Cancer* 2000; 83:1594.
56. Lorch JH, Goloubeva O, Haddad RI, Cullen K, Sarlis N, Tishler R, Tan M, Fasciano J, Sammartino DE, Posner MR, TAX 324 Study Group. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2011; 12:153.

57. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Youssoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006; 354:567.
58. Mendenhall WM, Amdur RJ, Stringer SP, Villaret DB, Cassisi NJ. Radiation therapy for squamous cell carcinoma of the tonsillar region: a preferred alternative to surgery? *J Clin Oncol*. 2000; 18(11):2219-25.
59. Peters LJ. The efficacy of postoperative radiotherapy for advanced head and neck cancer: quality of the evidence. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998; 40(3):527-8.
60. Lundahl RE, Foote RL, Bonner JA, Suman VJ, Lewis JE, Kasperbauer JL, McCaffrey TV, Olsen KD. Combined neck dissection and postoperative radiation therapy in the management of the high-risk neck: a matched-pair analysis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998; 40(3):529-34.
61. Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*. 2005; 114:806.
62. Lorch JH, Goloubeva O, Haddad RI, Cullen K, Sarlis N, Tishler R, Tan M, Fasciano J, Sammartino DE, Posner MR, TAX 324 Study Group. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2011; 12:153.
63. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100:261.
64. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010; 363:24.
65. Weaver BA. Epidemiology and natural history of genital human papillomavirus infection. *J Am Osteopath Assoc*. 2006; 106:S2-8.
66. Seedorf K, Krammer G, Durst M, Suhai S, Rowekamp WG. Human papillomavirus type 16 DNA sequence. *Virology*. 1985; 145(1):181-5.
67. 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; 101:412.

68. Rampias T, Sasaki C, Psyrris A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral Oncol.* 2013. pii: S1368-8375(13)00642-8.
69. Campisi G, Giovannelli L. Controversies surrounding human papilloma virus infection, head & neck vs oral cancer, implications for prophylaxis and treatment. *Head Neck Oncol.* 2009; 30; 1:8.
70. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004; 324:17.
71. Bernard HU, Calleja-Macias IE, Dunn ST. Genome variation of human papillomavirus types: phylogenetic and medical implications *Int J Cancer.* 2006
72. Kreimer, AR, Clifford, GM, Boyle, P, Franceschi, S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14:467.
73. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ, International Agency for Research on Cancer Multicenter Cervical Cancer Study Group. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:518.
74. zur Hausen H. Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account. *Virology.* 2009; 20;384(2):260-5..
75. Ocadiz-Delgado R, Marroquin-Chavira A, Hernandez-Mote R, Valencia C, Manjarrez-Zavala ME, Covarrubias L, Gariglio P. Induction of focal epithelial hyperplasia in tongue of young bk6-E6/E7 HPV16 transgenic mice. *Springer Science.* 2009; 18(4):513-27.
76. Syrjänen S. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. *J Clin Virol.* 2005; 32 Suppl 1:S59-66.
77. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1995.
78. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, Dalianis T. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer.* 2002; 10;102(2):152-8.
79. Johannsen E, Lambert PF. Epigenetics of human papillomaviruses *Virology.* 2013; pii: S0042-6822(13)00436-4.
80. 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; 19; 103(38): 14152–14157.

81. Bhawal UK, Sugiyama M, Nomura Y, Kuniyasu H, Tsukinoki K. Loss of 14-3-3 Sigma Protein Expression and Presence of Human Papillomavirus Type 16 E6 in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2008; 134: 1055 - 1059.
82. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, Viscidi R. Distinct Risk Factor Profiles for Human Papillomavirus Type 16–Positive and Human Papillomavirus Type 16–Negative Head and Neck Cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2008, 100: 407-420.
83. Pyeon D, Newton MA, Lambert PF, den Boon JA, Sengupta S, Marsit CJ, Woodworth CD, Connor JP, Haugen TH, Smith EM, Kelsey KT, Turek LP, Ahlquist P. Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers. *Cancer Res.* 2007; 15;67(10):4605-19.
84. Ji X, Neumann AS, Sturgis EM, Adler-Storthz K, Dahlstrom KR, Schiller JT, Wei Q, Li G. p53 codon 72 polymorphism associated with risk of human papillomavirus-associated squamous cell carcinoma of the oropharynx in never-smokers. *Carcinogenesis.* 2008, 29: 875-879.
85. Mannarini L, Kratochvil V, Calabrese L, Gomes Silva L, Morbini P, Betka J, Benazzo M. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2009; 29(3):119-26.
86. Mork J, Lie AK, Glatte E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P, Møller B, Pukkala E, Schiller JT, Youngman L, Lehtinen M, Dillner J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *New Engl J Med.* 2001;344:1125–31.
87. Kreimer AR, Johansson M, Waterboer T, Kaaks R, Chang-Claude J, Drogen D, Tjønneland A, Overvad K, Quirós JR, González CA, Sánchez MJ, Larrañaga N, Navarro C, Barricarte A, Travis RC, Khaw KT, Wareham N, Trichopoulou A, Lagiou P, Trichopoulos D, Peeters PH, Panico S, Masala G, Grioni S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Laurell G, Hallmans G, Manjer J, Ekström J, Skeie G, Lund E, Weiderpass E, Ferrari P, Byrnes G, Romieu I, Riboli E, Hildesheim A, Boeing H, Pawlita M, Brennan P. Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of subsequent head and neck cancer. *J Clin Oncol.* 2013; 20;31(21):2708-15.
88. Agrawal Y, Koch WM, Xiao W, Westra WH, Trivett AL, Symer DE, Gillison ML.

- Oral Human Papillomavirus Infection Before and After Treatment for Human Papillomavirus 16–Positive and Human Papillomavirus 16–Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Clinical Cancer Research*. 2008; 1;14(21):7143-50.
89. de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, Clifford G, Bruni L, Muñoz N, Bosch FX. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(7):453-9.
90. Chin-Hong PV, Vittinghoff E, Cranston RD, Buchbinder S, Cohen D, Colfax G, Da Costa M, Darragh T, Hess E, Judson F, Koblin B, Madison M, Palefsky JM. The prevalence of genital HPV and factors associated with oncogenic HPV among men having sex with men and men having sex with women and men: the HIM study. *Sex Transm Dis*. 2011; 38:932.
91. Giuliano AR, Lee JH, Fulp W, Villa LL, Lazcano E, Papenfuss MR, Abrahamsen M, Salmeron J, Anic GM, Rollison DE, Smith D. Incidence and clearance of genital human papillomavirus infection in men (HIM): a cohort study. *Lancet*. 2011; 377:932.
92. Chin-Hong PV, Vittinghoff E, Cranston RD, Buchbinder S, Cohen D, Colfax G, Da Costa M, Darragh T, Hess E, Judson F, Koblin B, Madison M, Palefsky JM.. Age-Specific prevalence of anal human papillomavirus infection in HIV-negative sexually active men who have sex with men: the EXPLORE study. *J Infect Dis*. 2004; 190:2070.
93. Sikora AG, Morris LG, Sturgis EM. Bidirectional Association of Anogenital and Oral Cavity/Pharyngeal Carcinomas in Men. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, Apr 2009; 135: 402 - 405.
94. Muñoz N, Bosch FX, Castellsagué X, Díaz M, de Sanjose S, Hammouda D, Shah KV, Meijer CJ. Against which human papillomavirus types shall we vaccinate and screen? The international perspective. *Int J Cancer*. 2004; 20; 111(2):278-85.
95. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, Graubard BI, Chaturvedi AK. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA*. 2012; 307:693.
96. Rositch AF, Burke AE, Viscidi RP, Silver MI, Chang K, Gravitt PE. Contributions of recent and past sexual partnerships on incident human papillomavirus detection: acquisition and reactivation in older women. *Cancer Res*. 2012; 72:6183.

97. Maglennon GA, Doorbar J. The biology of papillomavirus latency. *Open Virol J.* 2012; 6:190.
98. Theiler RN, Farr SL, Karon JM, Paramsothy P, Viscidi R, Duerr A, Cu-Uvin S, Sobel J, Shah K, Klein RS, Jamieson DJ. High-risk human papillomavirus reactivation in human immunodeficiency virus-infected women: risk factors for cervical viral shedding. *Obstet Gynecol.* 2010; 115:1150.
99. Rosenquist K, Wennerberg J, Schildt EB, Bladström A, Göran Hansson B, Andersson G. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol.* 2005; 125(12): 1327-36.
100. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, Wipf GC, Carter JJ, Madeleine MM, Mao EJ, Fitzgibbons ED, Huang S, Beckmann AM, McDougall JK, Galloway DA. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1998; 4;90(21): 1626-36.
101. Palefsky JM. Cutaneous and genital HPV-associated lesions in HIV-infected patients. *Clin Dermatol.* 1997; 15(3):439.
102. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis.* 2009; 199:1263–9.
103. Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26:836–40.
104. Haddad R, Crum C, Chen Z, Krane J, Posner M, Li Y, Burk R. HPV16 transmission between a couple with HPV-related head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2008; 44:812–5.
105. Smith EM, Parker MA, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Evidence for vertical transmission of HPV from mothers to infants. *Infect Dis Obstet Gynecol.* 2010; 2010:326369.
106. Rombaldi RL, Serafini EP, Mandelli J, Zimmermann E, Losquiavo KP. Perinatal transmission of human papillomavirus DNA. *Virol J.* 2009; 21;6:83.
107. Dahlstrand, H, Nasman, A, Romanitan, M, Lindquist D, Ramqvist T, Dalianis T. Human papillomavirus accounts both for increased incidence and better prognosis in tonsillar cancer. *Anticancer Res.* 2008; 28:1133.

- 108.** van Zeeburg HJ, Snijders PJ, Wu T, Gluckman E, Soulier J, Surralles J, Castella M, van der Wal JE, Wennerberg J, Califano J, Velleuer E, Dietrich R, Ebell W, Bloemena E, Joenje H, Leemans CR, Brakenhoff RH. Clinical and molecular characteristics of squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008; 100(22):1649-53.
- 109.** Carr J, Gyorfı T. Human papillomavirus. Epidemiology, transmission, and pathogenesis. *Clin Lab Med*. 2000; 20:235.
- 110.** Karrer S, Szeimies RM, Abels C, Wlotzke U, Stolz W, Landthaler M. Epidermodysplasia verruciformis treated using topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol*. 1999; 140:935.
- 111.** von Krogh G, Lacey CJ, Gross G, Barrasso R, Schneider A. European course on HPV associated pathology: guidelines for primary care physicians for the diagnosis and management of anogenital warts. *Sex Transm Infect*. 2000; 76:162.
- 112.** Yarbrough WG, Rosenthal E. Conclusions about human papillomavirus-related malignancies. *Head Neck*. 2013; doi: 10.1002/hed.23378
- 113.** Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, Vignat J, Ferlay J, Bray F, Plummer M, Franceschi S. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine*. 2012; 30 Suppl 5:F12.
- 114.** De Vuyst H, Clifford GM, Nascimento MC, Madeleine MM, Franceschi S. Prevalence and type distribution of human papillomavirus in carcinoma and intraepithelial neoplasia of the vulva, vagina and anus: a meta-analysis. *Int J Cancer*. 2009; 124:1626.
- 115.** Hoots BE, Palefsky JM, Pimenta JM, Smith JS. Human papillomavirus type distribution in anal cancer and anal intraepithelial lesions. *Int J Cancer*. 2009; 124:2375.
- 116.** Backes DM, Kurman RJ, Pimenta JM, Smith JS. Systematic review of human papillomavirus prevalence in invasive penile cancer. *Cancer Causes Control*. 2009; 20:449.
- 117.** D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, Westra WH, Gillison ML. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2007; 356:1944-56.
- 118.** Li X, Gao L, Li H, Gao J, Yang Y, Zhou F, Gao C, Li M, Jin Q. Human papillomavirus infection and laryngeal cancer risk: a systematic review and

meta-analysis. *J Infect Dis.* 2013; 207:479.

- 119.** García A, Falcoff N, Di Camilo N, Sartor B, Catanese M, Denninghoff V. Inmunohistoquímica de la proteína p16INK4a en biopsias y extendidos cervicovaginales y su relación con HPV por PCR. *Medicina (B Aires).* 2008; 68(6):428-32.
- 120.** Soares RC, Oliveira MC, de Souza LB, Costa Ade L, Pinto LP. Detection of HPV DNA and immunohistochemical expression of cell cycle proteins in oral carcinoma in a population of brazilian patients. *J Appl Oral Sci.* 2008; 16(5):340-4.
- 121.** Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Huang S, Hui A, O'Sullivan B, Waldron J, Cummings B, Kim J, Ringash J, Dawson LA, Gullane P, Siu L, Gillison M, Liu FF. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009; 27:6213.
- 122.** Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, Sasaki C, Joe J, Camp RL, Rimm DL, Psyrri A. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favourable prognosis. *J Clin Oncol.* 2006; 10;24(5):736.
- 123.** Thomas J, Primeaux T. Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? *Ann Diagn Pathol.* 2012; 16(2):91.
- 124.** Rades D, Seibold ND, Gebhard MP, Noack F, Thorns C, Schild SE. Impact of the HPV-positivity definition on the prognostic value of HPV status in patients with locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Strahlenther Onkol.* 2013 Jul 17. [Epub ahead of print]
- 125.** Nakahira M, Saito N, Yamaguchi H, Kuba K, Sugasawa M. Use of quantitative diffusion-weighted magnetic resonance imaging to predict human papilloma virus status in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 12 July 2013. [Epub ahead of print]
- 126.** Harper DM, Franco EL, Wheeler CM, Moscicki AB, Romanowski B, Roteli-Martins CM, Jenkins D, Schuind A, Costa Clemens SA, Dubin G; HPV Vaccine Study group. Sustained efficacy up to 4.5 years of a bivalent L1 virus-like particle vaccine against human papillomavirus types 16 and 18: follow-up from a randomised control trial. *Lancet.* 2006; 367(9518):1247-55.

- 127.** Einstein MH, Baron M, Levin MJ, Chatterjee A, Edwards RP, Zepp F, Carletti I, Dessy FJ, Trofa AF, Schuind A, Dubin G; HPV-010 Study Group. Comparison of the immunogenicity and safety of Cervarix and Gardasil human papillomavirus (HPV) cervical cancer vaccines in healthy women aged 18-45 years. *Hum Vaccin.* 2009; 5:705.
- 128.** Petäjä T, Keränen H, Karppa T, Kawa A, Lantela S, Siitari-Mattila M, Levänen H, Tocklin T, Godeaux O, Lehtinen M, Dubin G. Immunogenicity and safety of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine in healthy boys aged 10-18 years. *J Adolesc Health.* 2009; 44:33.
- 129.** Reisinger KS, Block SL, Lazcano-Ponce E, Samakoses R, Esser MT, Erick J, Puchalski D, Giacoletti KE, Sings HL, Lukac S, Alvarez FB, Barr E. Safety and persistent immunogenicity of a quadrivalent human papillomavirus types 6, 11, 16, 18 L1 virus-like particle vaccine in preadolescents and adolescents: a randomized controlled trial. *Pediatr Infect Dis J.* 2007; 26:201.
- 130.** Kjaer SK, Sigurdsson K, Iversen OE, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Brown DR, Koutsky LA, Tay EH, García P, Ault KA, Garland SM, Leodolter S, Olsson SE, Tang GW, Ferris DG, Paavonen J, Lehtinen M, Steben M, Bosch FX, Dillner J, Joura EA, Majewski S, Muñoz N, Myers ER, Villa LL, Taddeo FJ, Roberts C, Tadesse A, Bryan J, Maansson R, Lu S, Vuocolo S, Hesley TM, Saah A, Barr E, Haupt RM. A pooled analysis of continued prophylactic efficacy of quadrivalent human papillomavirus (Types 6/11/16/18) vaccine against high-grade cervical and external genital lesions. *Cancer Prev Res (Phila).* 2009; 2:868.
- 131.** Brotherton JM, Fridman M, May CL, Chappell G, Saville AM, Gertig DM. Early effect of the HPV vaccination programme on cervical abnormalities in Victoria, Australia: an ecological study. *Lancet.* 2011; 377:2085.
- 132.** Tabrizi SN, Brotherton JM, Kaldor JM, Skinner SR, Cummins E, Liu B, Bateson D, McNamee K, Garefalakis M, Garland SM. Fall in human papillomavirus prevalence following a national vaccination program. *J Infect Dis.* 2012; 206:1645.
- 133.** FUTURE II Study Group. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent high-grade cervical lesions. *N Engl J Med.* 2007; 356:1915.
- 134.** Paavonen J, Naud P, Salmerón J, Wheeler CM, Chow SN, Apter D, Kitchener H, Castellsague X, Teixeira JC, Skinner SR, Hedrick J, Jaisamrarn U, Limson G, Garland S, Szarewski A, Romanowski B, Aoki FY, Schwarz TF,

- Poppe WA, Bosch FX, Jenkins D, Hardt K, Zahaf T, Descamps D, Struyf F, Lehtinen M, Dubin G; HPV PATRICIA Study Group. Efficacy of human papillomavirus (HPV)-16/18 AS04-adjuvanted vaccine against cervical infection and precancer caused by oncogenic HPV types (PATRICIA): final analysis of a double-blind, randomised study in young women. *Lancet*. 2009; 374:301.
- 135.** Wilkin T, Lee JY, Lensing SY, Stier EA, Goldstone SE, Berry JM, Jay N, Aboulafia D, Cohn DL, Einstein MH, Saah A, Mitsuyasu RT, Palefsky JM. Safety and immunogenicity of the quadrivalent human papillomavirus vaccine in HIV-1-infected men. *J Infect Dis*. 2010; 202:1246.
- 136.** Kahn JA, Xu J, Kapogiannis BG, Rudy B, Gonin R, Liu N, Wilson CM, Worrell C, Squires KE. Immunogenicity and Safety of the Human Papillomavirus 6, 11, 16, 18 Vaccine in HIV-Infected Young Women. *Clin Infect Dis*. 2013; 57(5):735-44.
- 137.** Levin MJ, Moscicki AB, Song LY, Fenton T, Meyer WA 3rd, Read JS, Handelsman EL, Nowak B, Sattler CA, Saah A, Radley DR, Esser MT, Weinberg A; IMPAACT P1047 Protocol Team. Safety and immunogenicity of a quadrivalent human papillomavirus (types 6, 11, 16, and 18) vaccine in HIV-infected children 7 to 12 years old. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2010; 55:197.
- 138.** Slade BA, Leidel L, Vellozzi C, Woo EJ, Hua W, Sutherland A, Izurieta HS, Ball R, Miller N, Braun MM, Markowitz LE, Iskander J. Postlicensure safety surveillance for quadrivalent human papillomavirus recombinant vaccine. *JAMA*. 2009; 302:750.
- 139.** Sanders GD, Taira AV. Cost-effectiveness of a potential vaccine for human papillomavirus. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9:37.
- 140.** Kim JJ, Goldie SJ. Health and economic implications of HPV vaccination in the United States. *N Engl J Med*. 2008; 359:821.
- 141.** Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. 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.
- 142.** Chaudhary AK, Singh M, Sundaram S, Mehrotra R. Role of human papillomavirus and its detection in potentially malignant and malignant head and neck lesions: updated review. *Head Neck Oncol*. 2009; 1: 22.

- 143.** Attner P, Du J, Näsman A, Hammarstedt L, Ramqvist T, Lindholm J, Marklund L, Dalianis T, Munck-Wikland E. The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer*. 2010; 126:2879.
- 144.** Machado J, Reis PP, Zhang T, Simpson C, Xu W, Perez-Ordóñez B, Goldstein DP, Brown DH, Gilbert RW, Gullane PJ, Irish JC, Kamel-Reid S. Low prevalence of human papillomavirus in oral cavity carcinomas. *Head & Neck Oncology*. 2010; 2:6
- 145.** Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, Steinsträsser L, Upile T, Jerjes W, Bernal-Sprekelsen M, Görner M, Sudhoff HH. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head Neck Oncol*. 2009; 1(1):36.
- 146.** Fakhry C, Gillison ML. Clinical Implications of Human Papillomavirus in Head and Neck Cancers. *J Clin Oncol*. 2006; 24(17):2606-11.
- 147.** Mehta V, Yu GP, Schantz SP. Population- based analysis of oral and oropharyngeal carcinoma: changing trends of histopathologic differentiation, survival and patient demographics. *Laryngoscope*. 2010; 120(11):2203-12.
- 148.** D'Souza G, Fakhry C, Sugar EA, Seaberg EC, Weber K, Minkoff HL, Anastos K, Palefsky JM, Gillison ML. Six- month natural history of oral versus cervical human papillomavirus infection. *Int J Cancer*. 2007;121:143–50.
- 149.** Dahlstrom KR, Li G, Tortolero-Luna G, Wei Q, Sturgis EM. Differences in history of sexual behavior between patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma and patients with squamous cell carcinoma at other head and neck sites. *Head Neck*. 2011; 33:847–855.
- 150.** Jo S, Juhasz A, Zhang K, Ruel C, Loera S, Wilczynski SP, Yen Y, Liu X, Ellenhorn J, Lim D, Paz B, Somlo G, Vora N, Shibata S. Human Papillomavirus Infection as a Prognostic Factor in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas Treated in a Prospective Phase II Clinical Trial. *Anticancer Reseach*. 2009. 29:1467-1474
- 151.** Nichols AC, Dhaliwal SS, Palma DA, Basmaji J, Chapeskie C, Dowthwaite S, Franklin JH, Fung K, Kwan K, Wehrli B, Howlett C, Siddiqui I, Salvadori MI, Winquist E, Ernst S, Kuruvilla S, Read N, Venkatesan V, Todorovic B, Hammond JA, Koropatnick J, Mymryk JS, Yoo J, Barrett JW. Does HPV type affect outcome in oropharyngeal cancer? *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013, 42:9.

- 152.** Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2010; 363:24.
- 153.** Huang SH, Perez-Ordóñez B, Liu FF, Waldron J, Ringash J, Irish J, Cummings B, Siu LL, Kim J, Weinreb I, Hope A, Gullane P, Brown D, Shi W, O'Sullivan B. Atypical clinical behavior of p16-confirmed HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radical radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2012; 82:276.
- 154.** Ankola AA, Smith RV, Burk RD, Prystowsky MB, Sarta C, Schlecht NF. Comorbidity, human papillomavirus infection and head and neck cancer survival in an ethnically diverse population. *Oral Oncol.* 2013; 49(9):911-7.
- 155.** Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stützer H, Preuss SF, Hoffmann TK, Speel EJ, Dienes HP, Pfister HJ, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 2007; 120:1731.
- 156.** Gillison ML, Harris J, Westra W, Chung C, Jordan R, Rosenthal D, Nguyen-Tan P, Spaons WJ, Redmond KP. Survival outcomes by tumor human papillomavirus (HPV) status in stage III-IV oropharyngeal cancer (OPC) in RTOG 0129. *J Clin Oncol.* 2009; 27:15.
- 157.** Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer.* 2001; 92(4):805-13.
- 158.** Peck BW, Dahlstrom KR, Gan SJ, Caywood W, Li G, Wei Q, Zafereo ME, Sturgis EM. Low risk of second primary malignancies among never smokers with human papillomavirus-associated index oropharyngeal cancers. *Head Neck.* 2013; 35:794–9.
- 159.** Jain KS, Sikora AG, Baxi SS, Morris LG. Synchronous cancers in patients with head and neck cancer: risks in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Cancer.* 2013; 119:1832–7.
- 160.** Maxwell JH, Ferris RL, Gooding W, Cunningham D, Mehta V, Kim S, Myers EN, Johnson J, Chiosea S. Extracapsular Spread in Head and Neck Carcinoma: Impact of Site and Human Papillomavirus Status. *Cancer.* 2013; 119(18):3302-8.
- 161.** Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, Peet CR, Lorenz LD, Nickel KP, Klingelhutz AJ, Lambert PF, Harari PM. Enhanced Radiation Sensitivity in HPV-Positive Head and Neck Cancer. *Cancer Res.* 2013;

73:4791-4800.

- 162.** Goodwin EC, Dimaio D. Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:12513-8.
- 163.** Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Clinical management of squamous cell carcinoma of the oropharynx: how does this differ for HPV-related tumors? *Future oncology*. 2013 Jun 18. [Epub ahead of print].
- 164.** Kofler B, Laban S, Busch CJ, Lörinicz B, Knecht R. New treatment strategies for HPV-positive head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2013 Aug 10. [Epub ahead of print].
- 165.** Mehanna H, Olaleye O, Licitra L. Oropharyngeal cancer – is it time to change management according to human papilloma virus status? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012; 20(2):120-4.
- 166.** Kreimer AR. Prospects for prevention of HPV-driven oropharynx cancer. *Oral Oncol*. 2013; pii: S1368-8375(13)00612-X.
- 167.** Johnston KB, Monteiro JM, Schultz LD, Chen L, Wang F, Ausensi VA, Dell EC, Santos EB, Moore RA, Palker TJ, Stanley MA, Jansen KU. Protection of beagle dogs from mucosal challenge with canine oral papillomavirus by immunization with recombinant adenoviruses expressing codon-optimized early genes. *Virology*. 2005; 336(2):208-18.
- 168.** Smith EM, Ritchie JM, Pawlita M, Rubenstein LM, Haugen TH, Turek LP, Hamsikova E. Human papillomavirus seropositivity and risks of head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2007; 120:825-32.
- 169.** Stanley MA, Pett MR, Coleman N. HPV: from infection to cancer. *Biochem Soc Trans*. 2007; 35:1456-60.
- 170.** Fakhry C, D'Souza G. Discussing the diagnosis of HPV-OSCC: Common questions and answers. *Oral Oncol*. 2013; 49(9):863-71. <sup>2</sup>