



**Patología del cáncer de cabeza y  
cuello en la era del VPH**

**Pathology of head and neck  
cancer in the HPV era**

10.20960/revcancer.00072

04/12/2024

## **Patología del cáncer de cabeza y cuello en la era del VPH**

### ***Pathology of head and neck cancer in the HPV era***

José Carlos Plaza Hernández

Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario HM Sanchinarro. Madrid

Correspondencia: José Carlos Plaza Hernández. Servicio de Anatomía Patológica. Hospital Universitario HM Sanchinarro. C/ de Oña, 10. 28050 Madrid

e-mail: josecarlos.plaza@salud.madrid.org

Recibido: 12/04/2024

Aceptado: 12/04/2024

*Conflicto de intereses: la autora declara no tener conflictos de interés.*

*Inteligencia artificial: el autor declara no haber usado inteligencia artificial (IA) ni ninguna herramienta que use IA para la redacción del artículo.*

*Artificial intelligence: the author declares not to have used artificial intelligence (AI) or any AI-assisted technologies in the elaboration of the article.*

## **RESUMEN**

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, y especialmente el localizado en la orofaringe, es una entidad propia con unas características histológicas, epidemiológicas y pronósticas diferentes. Se trata de un tumor relacionado con la infección por el virus del papiloma humano de alto riesgo (VPH-AR), que, pese a mostrar una histología agresiva y metastatizar de forma precoz, tiene un mejor pronóstico que el carcinoma no relacionado con el VPH.

Existen en el mercado multitud de técnicas para determinar la presencia del VPH en el tumor. La más utilizada actualmente es la expresión de p16, una oncoproteína relacionada con el virus, utilizada como marcador subrogado de la infección, que se considera positiva cuando más del 70 % de las células tumorales muestra expresión intensa en el núcleo y el citoplasma.

No obstante, debido a su baja especificidad (y pese a su alta sensibilidad), se recomienda realizar otra técnica de detección directa (PCR, FISH para detectar ADN o ARN) asociada a esta, manteniendo el p16 como metodología de cribado de la infección.

En la actualidad todas las guías clínicas internacionales recomiendan el estudio del VPH en los carcinomas epidermoides de orofaringe, independientemente del subtipo histológico.

**Palabras clave:** Carcinoma epidermoide. Orofaringe. VPH. p16.

## **ABSTRACT**

Squamous cell carcinoma of the head and neck, especially that located in the oropharynx, is a unique entity with different histologic, epidemiologic and prognostic characteristics. It is a tumor related to high-risk human papillomavirus infection (HR-HPV), which despite showing an aggressive histology and metastasizing early, has a better prognosis than carcinoma unrelated to HPV.

There are a multitude of techniques on the market to determine the presence of HPV in the tumor, the most widely used currently being the expression of p16, an oncoprotein related to the virus, used as a surrogate marker of infection, being considered positive when more than 70 % of the tumor cells show intense expression in the nucleus and cytoplasm.

However, due to its low specificity (and despite its high sensitivity), it is recommended to perform another direct detection technique (PCR, FISH to detect DNA and/or RNA) associated with it. Maintaining p16 as a screening methodology for infection.

At present, all international clinical guidelines recommend the study of HPV in epidermoid carcinomas of the oropharynx, regardless of histological subtype.

**Keywords:** Squamous cell carcinoma. Oropharynx. HPV. p16.

## **INTRODUCCIÓN**

Cuando hablamos de “cáncer de cabeza y cuello” nos referimos de manera general a cualquier neoplasia maligna que se origina en alguna de las numerosas estructuras que se ubican en esa localización (piel, glándulas salivales, ojos, cavidad oral, naso-, oro- e hipofaringe, laringe, etc.). Sin embargo, cuando nos referimos a “neoplasias malignas de cabeza y cuello relacionadas con el virus del papiloma humano (VPH)”, entonces la práctica totalidad de las lesiones corresponderá a carcinoma escamoso (o epidermoide) de orofaringe (con sus diferentes variantes), y es en este en el que nos vamos a centrar en esta revisión.

El cáncer de la cavidad oral y de la orofaringe constituye en la actualidad el sexto tumor maligno más frecuente a nivel mundial. En España, en el año 2021, el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello constituyó el 5 % de todos los nuevos cánceres diagnosticados en adultos (1).

Más del 90 % de estos tumores corresponde con carcinomas epidermoides (2). De forma tradicional este tipo de tumores se ha asociado con conductas de riesgo claramente establecidas, como el consumo de tabaco y de alcohol, que además actúan de manera sinérgica en el desarrollo tumoral, lo que aumenta su riesgo 30 veces más, lo que evidencia, asimismo, la relación entre la cantidad de exposición al tóxico y el riesgo de desarrollar el tumor (3).

De forma más reciente ha aparecido como un nuevo factor de riesgo para el desarrollo de carcinoma epidermoide la infección por el virus del papiloma humano (3-12).

Las lesiones originadas en cabeza y cuello relacionadas con el virus del papiloma humano han generado mucho interés en los últimos años, principalmente debido a la creciente incidencia de carcinomas epidermoides orofaríngeos relacionados con este virus. Pese a la disminución del tabaquismo y del consumo de alcohol en los países desarrollados, se ha producido un incremento en la incidencia del carcinoma epidermoide de orofaringe como consecuencia directa de la infección por el VPH (13). Este cambio se ha relacionado con cambios en las prácticas sexuales. Este origen es abrumadoramente más frecuente entre los varones de raza blanca en el grupo etario entre los 50 y los 60 años (14).

El virus del papiloma humano consiste en una familia de ADN virus encapsulados que contiene más de 130 serotipos, que se clasifican como de “bajo” y “alto” riesgo en función de su potencial oncogénico (15). Los genotipos de alto riesgo más comúnmente relacionados con el incremento de riesgo de desarrollar carcinoma epidermoide son el serotipo 16 (implicado en más del 90 % de las ocasiones) y el serotipo 18, que, además de afectar a cabeza y cuello, están también relacionados con un riesgo incrementado de carcinoma epidermoide en otras localizaciones, como la cervix, la vulva y el ano (4-8).

La asociación causal entre la infección por el virus del papiloma humano y el desarrollo del carcinoma epidermoide se explica biológicamente porque la integración del ADN del virus del papiloma en el genoma de la célula huésped conduce a una regulación negativa de las proteínas supresoras tumorales p53 y Rb que conlleva a la expresión de los oncogenes *E6* y *E7* de la célula huésped. El oncogén *E6* está relacionado con la degradación del gen *TP53*, mientras que el oncogén *E7* está implicado en la unión y la desestabilización de otro gen supresor tumoral RB (gen del retinoblastoma) (16).

Cuando nos referimos a orofaringe, estamos hablando de una región anatómica que corresponde con la continuación de la faringe, extendiéndose desde la parte superior del paladar blando hasta la

parte superior del hueso hioides (o vallécula). En ella se encuentra incluida la base de la lengua con la amígdala lingual, la pared anterior del paladar blando, la úvula y los pilares amigdalinos con la amígdala palatina (17).

El carcinoma epidermoide de orofaringe relacionado con el VPH muestra unas características histológicas, moleculares y pronósticas específicas que lo diferencian del resto de carcinomas que no tienen relación con la infección por VPH.

Histológicamente se trata de una neoplasia de estirpe epitelial con origen en las células escamosas (fundamentalmente del epitelio reticulado de las criptas de las amígdalas), constituida por células que pueden mostrar desde escaso citoplasma (basaloides) a células con moderado acúmulo citoplasmático (epitelioides), cuya queratinización solo es evidente con el uso de grandes aumentos al microscopio óptico.

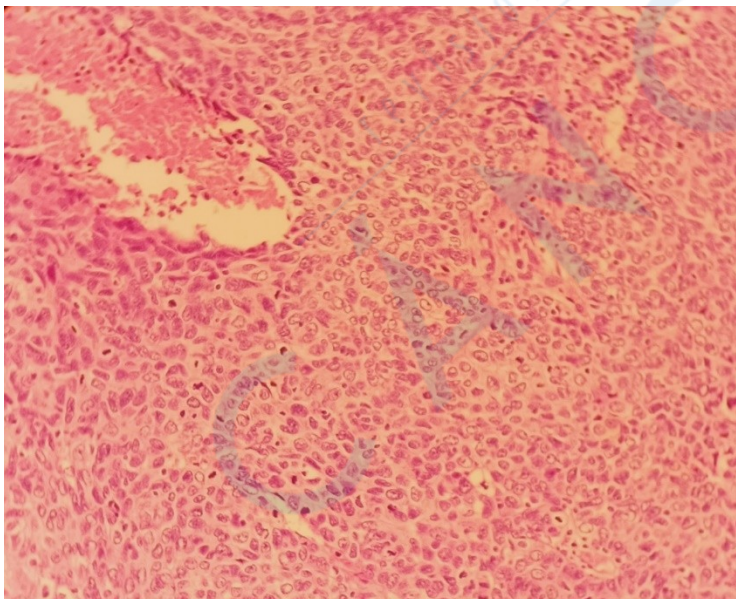
Las células se disponen en diferentes patrones de crecimiento: nidos, islas o ribetes (patrón transicional). En este último patrón sí puede observarse la maduración y la presencia de células queratinizadas aplanadas (Fig. 1).

La presencia de queratinización evidente, en forma de perlas o de nidos córneos, debe hacernos sospechar que el tumor no tenga relación con la infección por VPH.

Un rasgo histológico muy característico de este tipo tumoral es el patrón de maduración *inside out*, según el cual las células tumorales queratinizantes se localizan en la periferia de los nidos tumorales y las células proliferantes de aspecto más inmaduro se localizan en el centro de los nidos. Esta disposición es contraria a la maduración característica de los carcinomas epidermoides VPH negativos, en los que las células inmaduras se disponen en la periferia de los nidos y van madurando y adquiriendo queratinización según progresan hacia el centro del nido, ocupado por nidos de queratina.

En algunas ocasiones pueden observarse células tumorales anaplásicas con núcleos bizarros o multinucleadas y que constituyen un peor pronóstico (17).

En este tipo de tumores relacionados con el VPH, el grado de diferenciación no es relevante para el pronóstico, a diferencia de lo que ocurre con los carcinomas escamosos no relacionados con el VPH. Los tumores VPH+, pese a ser más pequeños en tamaño, desarrollan metástasis en ganglios linfáticos de forma más precoz. Característica e invariablemente, estas metástasis muestran un aspecto quístico, conservando las mismas características histológicas del tumor primario, expuestas anteriormente. Sin embargo, algunas de estas metástasis muestran un grado de maduración excepcional que “obliga” al patólogo a realizar un diagnóstico diferencial con quistes de los arcos branquiales.



**Figura 1.** Neoplasia epitelial con crecimiento de patrón difuso, sin queratinización evidente. Se identifican frecuentes mitosis, atipia y necrosis.

Pese a su aspecto morfológico menos diferenciado y a la tendencia precoz en el desarrollo de metástasis linfoganglionares en el curso de la enfermedad (una característica que habitualmente está relacionada

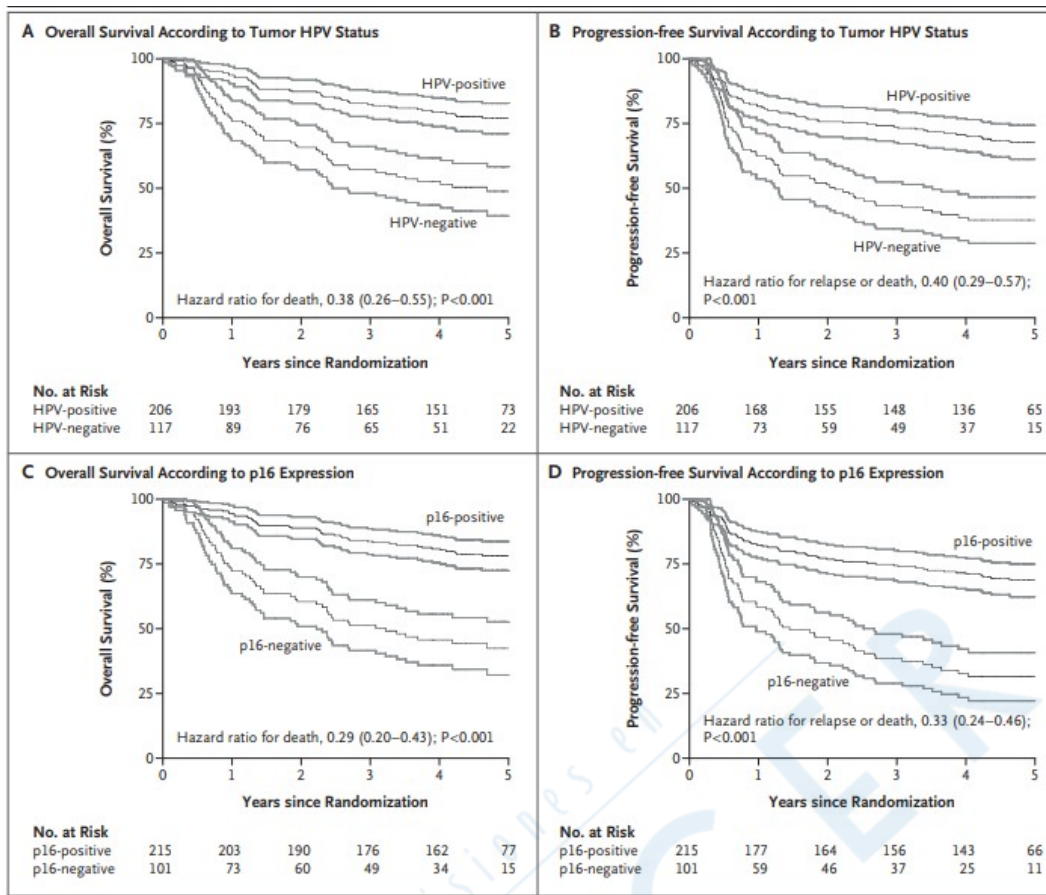
con agresividad), los carcinomas epidermoides desarrollados en el seno de una infección por el VPH muestran un mejor pronóstico que aquellos sin relación con el VPH. Los carcinomas epidermoides de orofaringe relacionados con el VPH tienen entre un 30 y un 50 % menor tasa de mortalidad que los carcinomas VPH negativos. Sin embargo, este mejor pronóstico queda diluido en aquellos pacientes con fuerte historia de tabaquismo o que actualmente son grandes fumadores (18).

Este mejor pronóstico también está relacionado con el hecho de que los carcinomas relacionados con el VPH muestran una mejor respuesta tanto a la quimioterapia adyuvante como a la cirugía. Esto puede deberse a que los tumores relacionados con el VPH tienen una menor carga mutacional y son genéticamente menos complejos que aquellos no relacionados con el VPH.

Esta mejoría pronóstica se ha confirmado mediante estudios prospectivos, hasta tal punto que la comunidad científica relacionada con la oncología en el ámbito de “cabeza y cuello” ha defendido la idea de que a todos los nuevos pacientes diagnosticados de carcinoma epidermoide de orofaringe debería hacerseles un test para la infección por el virus del papiloma humano con el fin de identificar serotipos de alto riesgo, independientemente de la histología del tumor, ya que el desarrollo de otras variantes histológicas, como papilar, adenoescamoso, *Infoepitelioma-like*, sarcomatoide y con rasgos basaloïdes, también están relacionadas con la infección por VPH (19).

Todas estas evidencias han conducido a que la American Joint Committee on Cancer (17) en su última edición (8.ª edición) haya actualizado la clasificación del cáncer orofaríngeo añadiendo un capítulo independiente para el carcinoma epidermoide relacionado con el VPH (p16+), separándolo del carcinoma epidermoide de orofaringe clásico no relacionado con el VPH (Fig. 2).





**Figura 2.** Curvas de supervivencia estimada entre los pacientes con carcinoma de orofaringe en función del estatus de la expresión de p16 y de VPH (20).

En esta última clasificación, la categoría T de la clasificación TNM no se modifica entre ambas neoplasias (VPH+ / VPH-), pero sí lo hace en la categoría N, poniendo de manifiesto que en los tumores relacionados con el VPH es más importante para el pronóstico el número de ganglios linfáticos metastásicos que el tamaño del depósito tumoral intraganglionar, la presencia de extensión extracapsular (muy importante en el carcinoma VPH-) o la lateralidad de la afectación metastásica. Y dado que la categoría N3 se comporta desde el punto de vista pronóstico de manera inusualmente similar a la categoría N1, esta categoría (N3) se ha eliminado de la clasificación patológica del TNM (pTNM), permaneciendo en la clasificación clínica (cTNM). (20-23)

Si como parecen recomendar la mayoría de los expertos debemos investigar la relación entre los carcinomas epidermoides originados en la orofaringe y la infección por el virus del papiloma humano, entonces se nos plantean nuevas cuestiones: ¿cómo debemos testar esa posible relación? ¿Con que metodología contamos actualmente? Y de todas ellas, ¿cuál es la más sensible? ¿Y la más específica?

Las estrategias de detección para el carcinoma escamoso de orofaringe relacionado con el VPH difieren tanto en la diana a valorar como a la metodología a emplear. Grupos diferentes varían en el uso de pruebas específicas para el VPH, testando con marcadores subrogados, como el p16 o en combinación con otros. Además, muchas de las recomendaciones están hechas en un contexto clínico específico. Para el carcinoma epidermoide de orofaringe, por ejemplo, está ampliamente aceptado el uso de p16 como un buen marcador subrogado de infección por VPH.

Estas incluyen:

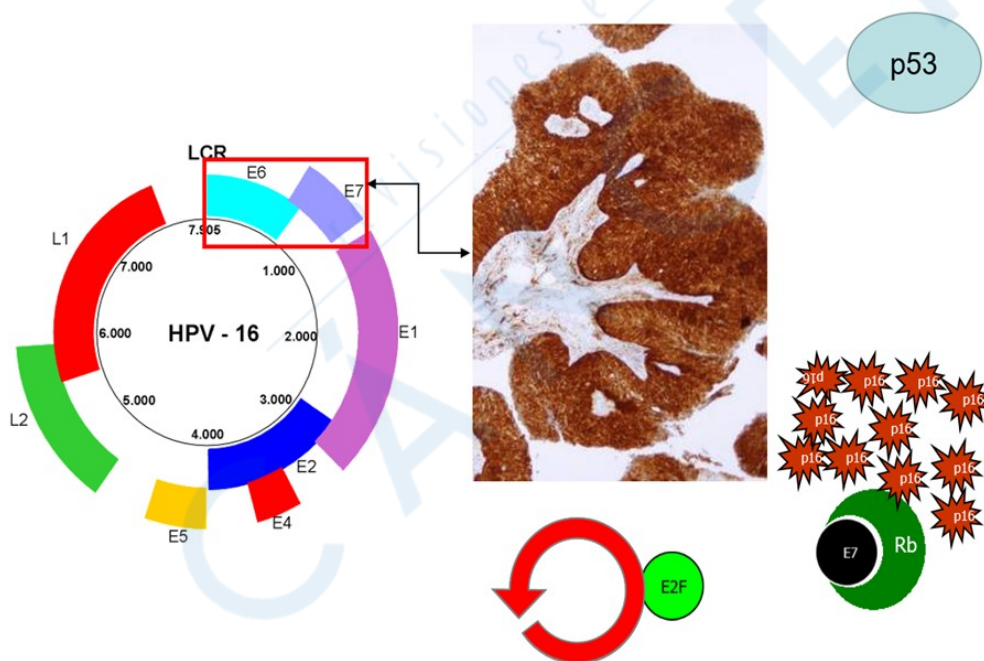
- Estudio de los oncogenes virales E6/E7 del ADN del virus del papiloma humano mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR-ADN VPH).
- Detección de los oncogenes virales E6/E7 del ARN del virus del papiloma humano mediante reacción en cadena de la polimerasa por retrotranscripción reversa cuantitativa (qRT-PCR).
- Estudio mediante hibridación *in situ* del ADN del VPH (ISH).
- Estudio mediante hibridación *in situ* del ARN del VPH (ISH).
- Estudio de la expresión de la proteína p16 mediante técnica de inmunohistoquímica como marcador subrogado de infección por VPH.

Actualmente no existe un consenso claro sobre qué método obtendría el calificativo de “tratamiento estándar” para la detección del VPH.

La investigación basada en la evidencia y la mayoría de las guías clínicas recomiendan, por su disponibilidad en los laboratorios de

anatomía patológica, su bajo coste y su sensibilidad, el estudio de la expresión de la proteína p16 mediante inmunohistoquímica (24,25). Es la metodología más implementada.

P16INK4A (p16) es una proteína supresora tumoral que regula el ciclo celular mediante la inhibición de la fosforilación de las cinasas dependientes de la ciclina-4 (CDK4) y -6 (CDK6), lo que impide la fosforilación de la proteína RB (esta proteína mantiene su estado activo en la forma hipofosforilada) y, por tanto, su inactivación. La proteína RB en su forma activa mantiene “secuestrada” a la proteína E2F, que, al ser “liberada” por la proteína RB, actuaría como factor de transcripción nuclear, activando genes implicados en la progresión a través del ciclo celular (Fig. 3).

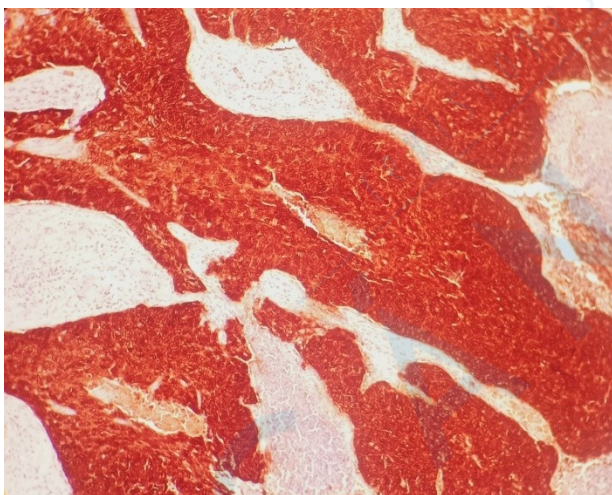


**Figura 3.** Esquema de la oncogenicidad del VPH.

Durante el ciclo vital del virus del papiloma humano, la oncoproteína E7 inactiva a la proteína RB, lo que conlleva la sobreexpresión de varias proteínas asociadas al ciclo celular, incluyendo la p16 (15). Por todo ello, la expresión de la proteína p16 se utiliza como un marcador subrogado de infección por VPH y la valoración de esa expresión mediante la técnica de la inmunohistoquímica se ha establecido como

un procedimiento complementario esencial para la detección del VPH, alcanzando sensibilidades cercanas al 100 % en la detección del carcinoma epidermoide asociado a VPH (26,27). Sin embargo, su baja especificidad condiciona enormemente su uso como test único estándar. Además, la adecuada interpretación de la inmunotinción requiere la valoración por patólogos expertos. Además, es imprescindible su correlación con la información clínica e histológica del tumor.

De manera extendida el punto de corte para su valoración positiva se considera en el 70 % de las células y con intensidad moderada-fuerte de tinción nuclear y citoplasmática (Fig. 4). Aquellos tumores con expresiones moderadas-fuertes nuclear y citoplasmática comprendidas en el 70-50 % se reconocerán como “equivocas” (15).



**Figura 4.** Presencia de expresión nuclear y citoplasmática intensa en más del 70 % de las células tumorales.

Todo ello ha justificado que los índices de discordancia entre la valoración de p16 por inmunohistoquímica y la detección directa del virus mediante técnicas de ARN/ADN se estime en torno al 25 %, lo que muestra tumores p16 positivos sin presencia del virus en la mayoría de estos casos discordantes (28).

Sin embargo, al estudiar el comportamiento de esos tumores p16 positivos / VPH negativos, no se encontraron diferencias pronósticas

entre ambos grupos, lo que lleva a hacernos pensar que es posible entonces que exista un subgrupo de tumores no asociados con el VPH con un fenotipo histológico, unas características moleculares y un pronóstico similar a los asociados con el VPH, lo que conlleva a plantearnos si lo realmente importante es identificar los tumores asociados con la infección por VPH o aquellos que independientemente de su relación con el virus sean p16 positivos (29-31).

Debido a esa baja especificidad, se han implementado otro tipo de pruebas basadas en técnicas moleculares, como las PCR o hibridación *in situ*.

A favor de las técnicas que utilizan la PCR, está la extensa disponibilidad en la mayoría de los laboratorios de anatomía patológica, su alta sensibilidad (con detección del virus incluso por debajo de una copia viral por genoma celular) y su coste-efectividad. Sin embargo, no debemos olvidar que son técnicas muy complejas, que requieren de personal experto formado y que en determinadas situaciones pueden mostrar una baja especificidad, ya que no son capaces de diferenciar entre virus que actúan como un *driver* oncogénico de partículas víricas que son transcripcionalmente silentes, además del alto riesgo de contaminación que siempre acompaña a estas técnicas moleculares. Todo ello disminuye su capacidad de detección del virus en situaciones especiales (32). De todos los *primers* disponibles en el mercado, los más ampliamente utilizados tanto en la investigación como en la práctica clínica diaria son los que contienen las secuencias GP5+/GP6+ y la SPF10 (33).

La técnica de hibridación *in situ* basada en ADN es un método molecular con una alta especificidad que permite la detección directa de la presencia del virus del papiloma humano (el único método molecular que lo permite), correlacionándolo con su localización topográfica y asegurando con ello que las partículas víricas identificadas corresponden a fragmentos víricos originados en las células tumorales y localizados en el interior de la célula y no en



tejidos vecinos. La hibridación *in situ* tiene la ventaja de que puede valorarse en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, pero, al ser un método menos sensible, no se usa actualmente como método de cribado de rutina.

Esta técnica utiliza una sonda de ácido nucleico complementario frente al ADN o el ARN viral a estudio y marcado con un cromógeno (CISH, de las siglas en inglés *Cromogen In Situ Hybridation*) o un fluoróforo (FISH, de las siglas en inglés *Fluorescent In Situ Hybridation*). La positividad punteada o en patrón *dot like* intranuclear, observada bajo el microscopio, indica la integración del genoma viral en el interior del genoma de la célula huésped, mientras que, si la señal que se observa es difusa, indica la presencia de ADN vírico episomal no transcriptor.

Problemas derivados de esta técnica tienen que ver fundamentalmente con la señal o con la tinción de fondo (definida como unión no específica de la sonda a moléculas no diana) o con la ausencia de señal. Ambas tienen que ver con problemas técnicos durante la fase preanalítica, aunque la ausencia de señal también puede estar relacionada con un insuficiente número de copias del virus, ya que se estima que aproximadamente son necesarias entre 10-20 copias por núcleo para su detección por técnicas estándares (34,35).

Para intentar mejorar la sensibilidad de estas técnicas, han aparecido en el mercado conjugados de sustancias que permiten una amplificación de la señal, lo que incrementa la sensibilidad entre 10 y 100 veces (34).

Sin embargo, la técnica de hibridación *in situ* basada en el ARN mensajero (ARNm) de las oncoproteínas E6 y E7, que permite la visualización directa de los transcritos virales en tejidos fijados en formol e incluidos en parafina, alcanza una sensibilidad comparable con la inmunohistoquímica de p16 y la qRT-PCR (36,37). Debido a que estas oncoproteínas contienen unos transcritos de mayor tamaño, la señal obtenida es más fácilmente identificable. Algunos autores han

demostrado una mayor sensibilidad de la técnica usando ARN que ADN en situaciones de baja carga viral, ya que con la técnica de ARN es posible detectar positividad con 1-2 copias del virus por célula tumoral.

Dicho todo lo cual, la hibridación *in situ* es un método marcadamente específico que intenta mejorar su sensibilidad mediante los avances de la ciencia y que constituye una importante metodología que complementa la inmunohistoquímica de p16 en la determinación del estatus del VPH de alto riesgo.

Una vez evidenciada la necesidad de realizar la detección del virus del papiloma humano en determinados tumores, y desarrolladas ya las diferentes técnicas para ello, queda realizar un repaso a lo que dicen las diferentes guías clínicas nacionales e internacionales.

La National Comprehensive Cancer Network (NCCN) en su última actualización (versión 3.2024) recomienda testar a todos los pacientes diagnosticados de carcinoma, sin recomendar ninguna metodología específica, si se pone de manifiesto la alta sensibilidad de la inmunohistoquímica para p16 (38).

El Colegio Americano de Patólogos (CAP) está en proceso de actualización de sus recomendaciones en cuanto a biomarcadores a estudiar en cáncer de cabeza y cuello se refiere, pero en su última actualización (del 2017) recomienda la realización de un estudio de VPH de alto riesgo a todos los pacientes con diagnóstico reciente de carcinoma epidermoide de orofaringe, incluyendo a todos los subtipos histológicos, que puede realizarse en el tumor primario o en la metástasis ganglionar si sospechamos que su origen es la orofaringe. Asimismo, indican como test a utilizar la inmunohistoquímica para p16, que puede acompañarse de otra técnica molecular a criterios del patólogo o del médico tratante. Estas recomendaciones quedan acotadas al diagnóstico de carcinoma epidermoide de orofaringe (14). La European Society for Medical Oncology (ESMO), en la última guía clínica que data del año 2020, recomienda el testado del VPH en los mismos términos que el Colegio Americano de Patólogos, y con base

en que el papel pronóstico de la expresión de p16 solo se ha demostrado en los cánceres de orofaringe, su uso no está recomendado en otros carcinomas epidermoides de cabeza y cuello, como el de hipofaringe, de laringe o el de la cavidad oral (39).

Debido a todas a esas diferencias pronósticas antes comentadas, el carcinoma epidermoide de cabeza y cuello se clasificó en el nuevo esquema de la OMS como VPH positivo o VPH negativo (40).

Por último, la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) actualiza su última recomendación, en la que aconsejaba la realización de p16 como método subrogado de infección de VPH, y actualmente recomienda asociar una segunda prueba de detección directa del virus con base en los resultados del estudio de Taberna *et al.* (41).

A modo de pincelada, vamos a revisar otros carcinomas de “cabeza y cuello” relacionados con el VHP, aunque en estos casos no está demostrada, a diferencia del carcinoma epidermoide de orofaringe, la relación entre el virus y el pronóstico.

Al menos el 12 % de los cánceres de faringe, el 3 % de los de cavidad oral y aproximadamente el 12 % de los carcinomas nasosinuales están relacionados con el VPH (42).

El carcinoma epidermoide no queratinizante nasosinusal es una rara entidad; entre el 30 y el 50 % la infección por el VPH se identifica como agente etiológico principal. Aunque, como se ha comentado anteriormente, su papel influyente en el pronóstico no está del todo desarrollado. Una nueva entidad relacionada con el VPH y con este carcinoma no queratinizante es el carcinoma con rasgos tipo “adenoide quístico”, más frecuente en las mujeres de 40-75 años, y cuya presencia del VPH-AR se ha postulado como agente etiológico. Se necesitan más estudios para confirmarlo (40).

La incidencia etiológica del virus en la cavidad oral es mucho menor, de forma inesperada, ya que el VPH muestra gran facilidad para infectar las células epiteliales de la mucosa oral. Sin embargo, a diferencia de lo que sucede en la orofaringe, el sistema inmunológico



del huésped es capaz de actuar de manera más eficaz en estas localizaciones. Una hipótesis para explicarlo es que en las criptas de las amígdalas se forma una “biopelícula” a partir de las microcolonias bacterianas allí presentes que permiten al virus “escapar” del sistema inmune (43).

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Mesia R, Iglesias L, Lambea J, Martínez-Trufero J, Soria A, Taberna M, et al. Correction to: SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (2020). Clin Transl Oncol 2021;23(5):1001. DOI: 10.1007/s12094-021-02582-0. Erratum for: Clin Transl Oncol 2021;23(5):913-21.
2. Chaudhary AK, Pandya S, Mehrotra R, Bharti AC, Singh M, Singh M. Comparative study between the Hybrid Capture II test and PCR based assay for the detection of human papillomavirus DNA in oral submucous fibrosis and oral squamous cell carcinoma. Virol J 2010;7:253. DOI: 10.1186/1743-422X-7-253
3. Adelstein DJ, Rodríguez CP. Human papillomavirus: changing paradigms in oropharyngeal cancer. Current Oncol Reports 2010;12(2):115-20.
4. Allen CT, Lewis Jr. JS, El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B. Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. Laryngoscope 2010;120(9):1756-72.
5. Feller L, Wood NH, Khammissa RA, Lemmer J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Head Face Med 2010;6:15. DOI: 10.1186/1746-160X-6-15

6. Jung AC, Briolat J, Millon R, et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010;126(8):1882-94. DOI: 10.1002/ijc.24911
7. Syrjanen S. The role of human papillomavirus infection in head and neck cancers. *Ann Oncol* 2010;21(Suppl.7):vii243-5.
8. Bădulescu FI, Crișan A, Bădulescu A, Schenker M. Recent data about the role of human papillomavirus (HPV) in oncogenesis of head and neck cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51(3):437-40.
9. Attner P, Du J, Nasman A, et al. The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer* 2010;126(12):2879-84.
10. 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 and Neck* 2011;33(6):847-55.
11. Lajer CB, von Buchwald C. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica* 2010;118(6-7):510-9.
12. Feller L, Khammissa RA, Wood NH, Lemmer J. Epithelial maturation and molecular biology of oral HPV. *Infect Agent Cancer* 2009;4:16. DOI: 10.1186/1750-9378-4-16
13. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* 2011;29(32):4294-301.
14. College of American Pathologist. Head and Neck Biomarker Reporting Template; 2023.
15. Bhatia A, Burtneess B. Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: defining risk groups and clinical trials. *J Clin Oncol* 2015;33:3243-50. DOI: 10.1200/JCO.2015.61.2358

16. Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrri A. E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. *J Natl Cancer Inst* 2009;101:412-23. DOI: 10.1093/jnci/djp017
17. Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* 2017;18(7):40. DOI: 10.1007/s11864-017-0484-y
18. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, et al. Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head Neck* 2009;31(11):1393-422.
19. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356(19):1944-56.
20. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010;363:24-35.
21. Dahlstrom KR, Garden AS, William Jr WN, Lim MY, Sturgis EM. Proposed staging system for patients with HPV-related oropharyngeal cancer based on nasopharyngeal cancer N categories. *J Clin Oncol* 2016;34:1848-54.
22. Huang SH, Xu W, Waldron J, Siu L, Shen X, Tong L, et al. Refining American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control TNM stage and prognostic groups for human papillomavirus-related oropharyngeal carcinomas. *J Clin Oncol* 2015;33:836-45.
23. O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network

- for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *Lancet Oncol* 2016;17:440-51.
24. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Brandsma J, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24:736-47. DOI: 10.1200/JCO.2004.00.3335
  25. Hoffmann M, Ihloff AS, Gorogh T, Weise JB, Fazel A, Krams M, et al. p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2010;127:1595-602. DOI: 10.1002/ijc.25174
  26. Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis Jr. JS. HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head and Neck Pathology* 2009;3(3):186-94.
  27. Kim SH, Koo BS, Kang S, et al. HPV integration begins in the tonsillar crypt and leads to the alteration of p16, EGFR and c-myc during tumor formation. *Int J Cancer* 2007;120(7):1418-25.
  28. Rietbergen MM, Snijders PJ, Beekzada D, Braakhuis BJ, Brink A, Heideman DA, et al. Molecular characterization of p16-immunopositive but HPV DNA-negative oropharyngeal carcinomas. *Int J Cancer* 2014;134:2366-72. DOI: 10.1002/ijc.28580
  29. Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis Jr. JS. HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head and Neck Pathol* 2009;3(3):186-94.
  30. Lewis Jr. JS, Thorstad WL, Chernock RD, et al. P16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol* 2010;34(8):1088-96.

31. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *J Clin Pathol* 2011;64(4):308-12.
32. Nuovo GJ. In situ detection of human papillomavirus DNA after PCR-amplification. *Methods Mol Biol* 2011;688:35-46. DOI: 10.1007/978-1-60761-947-5\_4
33. Spence AR, Franco ELF. Screening for cervical cancer using HPV tests. In: Jordan JJ, Singer A, Jones HW, Shafi MI (editors). *The Cervix*, 2nd edition. Malden, Mass, USA: Blackwell Publishing; 2006. p. 373-86.
34. Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Advances in Anatomic Pathol* 2010;17(6):394-403.
35. Lizard G, Demares-Poulet MJ, Roignot P, Gambert P. In situ hybridization detection of single-copy human papillomavirus on isolated cells, using a catalyzed signal amplification system: GenPoint. *Diagnostic Cytopathology* 2001;24(2):112-6.
36. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Jones TM, Ma XJ, Wang H, et al. Validation of a novel diagnostic standard in HPV-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2013;108:1332-9. DOI: 10.1038/bjc.2013.63
37. Kang H, Kiess A, Chung CH. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. *Nat Rev Clin Oncol* 2015;12:11-26. DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.192
38. Head and Neck Cancers. Version 3.2024<sup>®</sup>. National Comprehensive Cancer Network<sup>®</sup> (NCCN<sup>®</sup>); 2024
39. Machiels JP, René Leemans C, Golusinski W, Grau C, Licitra L, Gregoire V; EHNS Executive Board. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2020;31(11):1462-75. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.07.011

40. Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Int Agency Res Cancer 2005;85:75-81.
41. Mesia R, Iglesias L, Lambea J, Martínez-Trufero J, Soria A, Taberna M, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (2020). Clin Transl Oncol 2021;23(5):913-21. DOI: 10.1007/s12094-020-02533-1. Erratum in: Clin Transl Oncol 2021.
42. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. Vaccine 2006;24(Suppl.3):S11-S25.
43. Rieth KKS, Gill SR, Lott-Limbach AA, Merkley MA, Botero N, Allen PD, et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus in tonsil tissue in healthy adults and colocalization in biofilm of tonsillar crypts. JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg 2018;144:231-7.