



Universitat Autònoma de Barcelona.
Facultat de Medicina.
Departament de Cirurgia.

Prevalencia del Virus Papiloma Humano asociado a carcinoma de orofaringe en una cohorte de pacientes. Estudio de las características epidemiológicas y repercusión pronóstica

Tesis Doctoral
2015

Autor:

María Martel Martín

Directores:

Dr. Xavier León Vintró

Dr. Miquel Quer i Agustí

Dr. David Virós Porcuna

SUMARIO

INTRODUCCIÓN	3
GENERALIDADES	5
<i>Historia</i>	5
<i>Virus papiloma humano (HPV)</i>	6
<i>Tipos de virus</i>	9
HISTORIA NATURAL DE LA INFECCIÓN HPV	14
<i>Historia natural de la infección en cérvix</i>	14
<i>Mecanismos de transmisión. Historia natural de la infección en orofaringe</i>	21
EPIDEMIOLOGÍA DE LOS CARCINOMAS DE OROFARINGE HPV+.....	23
DETECCIÓN DE LA INFECCIÓN HPV	30
<i>Evaluación microscópica rutinaria</i>	32
<i>Detección del ADN viral con PCR</i>	33
<i>Detección de mARN con PCR</i>	33
<i>Hibridación in situ del ADN viral</i>	34
<i>Hibridación in situ de ARN</i>	35
<i>Inmunohistoquímica de p16</i>	35
<i>Algoritmos de detección de infección HPV</i>	37
VACUNACIONES PARA PREVENIR LA INFECCIÓN HPV	38
CARCINOGENESIS INDUCIDA POR EL HPV A NIVEL OROFARÍNGEO.....	39
RELACIÓN DE LA INFECCIÓN HPV CON LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO CON RADIOTERAPIA O QUIMIOTERAPIA	51
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS	63
POBLACIÓN DE ESTUDIO	65
PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS	68
<i>Procedimientos de extracción de ADN y determinación de HPVs mucosales</i>	68
<i>Expresión inmunohistoquímica de pRb, p16, p53, CD1</i>	69
DATOS CLÍNICOS	70

ESTUDIO ESTADÍSTICO	72
RESULTADOS	75
RESULTADOS DE LAS DETERMINACIONES DE LABORATORIO	77
RELACIÓN ENTRE HPV Y LAS VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS	90
RELACIÓN DE HPV CON LOS RESULTADOS DEL TRATAMIENTO.....	95
RESULTADOS DEL ANÁLISIS MULTIVARIANTE.....	107
RIESGO DE SEGUNDAS NEOPLASIAS EN FUNCIÓN DEL ESTATUS HPV	108
ESTATUS HPV EN TUMORES LOCALIZADOS FUERA DE LA OROFARINGE	109
DISCUSIÓN.....	111
EPIDEMIOLOGÍA DE LOS CARCINOMAS DE OROFARINGE HPV.....	113
VARIANTES HISTOLÓGICAS DE LOS TUMORES HPV+	122
TRATAMIENTO Y PRONÓSTICO.....	127
INFLUENCIA DEL TABACO EN PACIENTES HPV+	169
RELACIÓN DEL HPV CON LA APARICIÓN DE SEGUNDAS NEOPLASIAS	176
CONCLUSIONES	183
BIBLIOGRAFÍA.....	187

Introducción

Generalidades

Historia

Desde hace aproximadamente 35 años se conoce el papel fundamental del virus papiloma humano (human papilloma virus, HPV) en el proceso carcinogénico del carcinoma de cérvix uterino. Hoy en día está bien establecido que una importante y heterogénea familia de HPV inducen carcinogénesis en humanos, causando no solo la mayoría de carcinomas de cérvix, si no también en otras localizaciones como la región anogenital y carcinomas escamosos de cabeza y cuello (CECC) en determinadas localizaciones como la orofaringe.

La primera referencia a la posible actuación de un elemento infeccioso relacionado con las prácticas sexuales en relación con los carcinomas de cérvix fue publicado en 1842 por Domenico Antonio Rigoni-Stern. Este médico italiano analizó los certificados de defunción en mujeres de la ciudad de Verona durante el periodo de 1760-1839, observando una alta frecuencia de carcinoma de cérvix en mujeres casadas, viudas y prostitutas, pero su rara aparición en mujeres vírgenes y en monjas. Llegó a la conclusión que el desarrollo de este cáncer tenía que tener relación con los contactos sexuales¹. En la segunda mitad del siglo XIX, los rápidos avances en bacteriología intentaron ligar el cáncer de cérvix con una infección de transmisión sexual, que no pudo ser comprobada hasta finales de la década de 1960. En esa época, además del HPV, se propuso como posible responsable la infección por el virus Herpes simple tipo 2^{2,3}.

Los condilomas acuminados han sido documentados desde la época de Hipócrates, y las verrugas cutáneas desde el siglo I a.c. En 1891 Payne observó que las verrugas cutáneas se podían transmitir, y en 1901 Heidingsfeld describió la transmisión de los condilomas acuminados a través del contacto sexual. En 1907 Ciuffo estableció la etiología viral de las verrugas humanas. El primer virus papiloma fue aislado por R. Shope en conejos en 1933. En 1949, Strauss y cols aislaron el HPV como el agente responsable de las verrugas, y desde entonces ha sido ampliamente reconocido como un virus con capacidad patógena⁴. Al mismo tiempo Rous y cols^{5,6} demostraron de forma experimental el potencial carcinogénico de los papilomavirus en la cola de conejos.

En 1965 se publicaron las características del virus como un virus de doble cadena circular de ADN⁷, y en 1970 se evidenció la diversidad existente entre los diferentes tipos de HPV. Una orientación importante de la heterogeneidad de la familia de los HPV se originó con los estudios de hibridación, utilizando la transcripción in vitro del ARN y ADN del papiloma plantar y varias muestras obtenidas de biopsias de piel, verrugas genitales y de cáncer de cérvix^{8,9}.

Virus papiloma humano (HPV)

Los Papillomavirus son virus de pequeño tamaño, no cubiertos, con doble cadena circular de ADN que infectan a mucosa y piel de animales. A pesar de su pequeño tamaño, su biología molecular es muy compleja. Tres oncogenes, E5, E6 y E7, modulan el proceso de transformación, dos proteínas reguladoras, E1 y E2, modulan la transcripción y la replicación, y dos proteínas estructurales, L1 y L2, forman la cápside viral¹⁰. Las proteínas E1, E2, L1 y L2 están particularmente bien conservadas entre los miembros de una misma familia. Además parece que el genoma del papillomavirus es bastante estático, y los cambios en las secuencias por mutación o recombinación son muy raros.

Existen unos 18 géneros con especificidad por diferentes especies y epitelios. Los HPV son un subtipo que infecta de forma selectiva a la especie humana. Han sido identificados más de 100 genotipos de HPV¹¹.

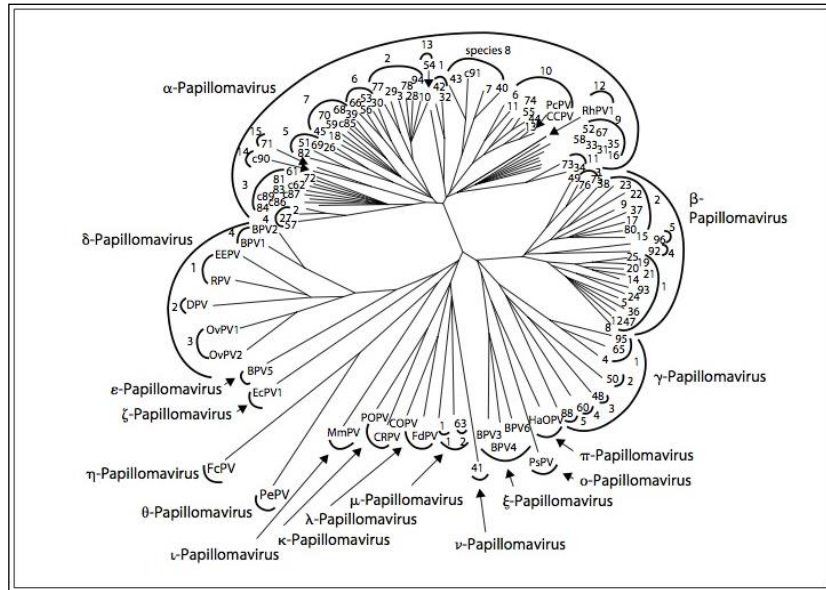


FIGURA 1: Árbol filogenético con 118 tipos de VPH (tomada de Villiers¹¹).

La disponibilidad de la secuencia parcial o total del genoma sobre una amplia variedad de tipos de HPV permitió establecer una nueva estructura taxonómica, y abrir una ventana al estudio de la co-evolución de los papillomavirus con huéspedes primates. Evidencias preliminares sugirieron que los tipos de HPV, definidos por la secuencia de ADN también eran serológicamente distintos.

Todos los papillomavirus comparten una estructura genética común. Originariamente los papillomavirus estaban agrupados con los polyomavirus en una sola familia, la papovaviridae. Esta agrupación se basaba en su estructura similar: capsido no envuelto y genoma de doble cadena circular de ADN. Posteriormente se evidenció que se trataba de dos grupos de virus con diferente tamaño y organización del genoma, y ningún nucleótido mayor o secuencia de aminoácidos similares, por lo que actualmente están reconocidos por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus como dos familias separadas, Papillomaviridae y Polyomaviridae.

Los HPV son de pequeño tamaño, de 52-55 nm de diámetro, con una doble cadena de ADN que forma un genoma circular con unas 8,000 pares de bases. Cuentan con una cápside icosaédrica compuesta por 72 capsómeros pentaméricos. Los capsómeros son protusiones de 11 a 12 nm de diámetro, con cabezas pentaméricas en forma de estrella. Los estudios de microscopía y la

cristalografía de rayos X han demostrado que todos los HPV conservan características comunes. Los 72 capsómeros son pentámeros de la proteína mayor de la cápside y están arregladas en un enrejado icosaédrico¹².

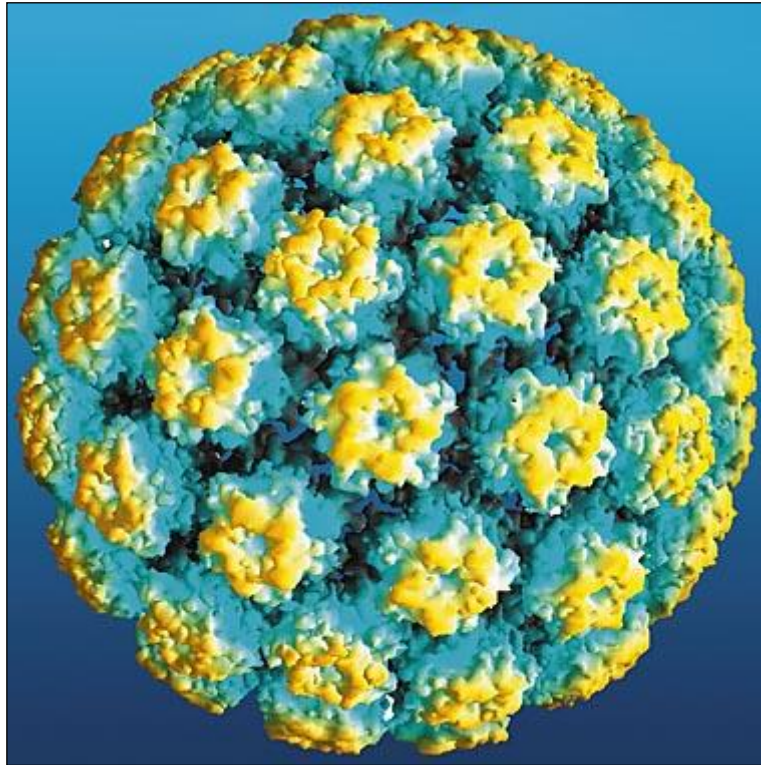


FIGURA 2: Imagen estructura de la cápside de HPV (tomada de Zheng¹²)

La cápside contiene dos proteínas estructurales - (*Late*) L1 (55kDa; 95% del total) y L2 (70 kDa; 5%), las cuales se ensamblan para formar los capsómeros. En el interior de la cápside se encuentra el ADN circular de doble cadena.

El genoma del papiloma virus está formado por ADN circular de tamaño aproximado 8 kpb asociado con histonas. El genoma viral está dividido, en general, en tres regiones principales:

- La región reguladora inicial “*upstream regulatory región*” (URR) o “*long control región*” (LCR) que regula la transcripción y replicación del genoma vírico.
- La región temprana “*early*” (E) que contiene 6 genes E1-2-4-5-6-7,

- La región tardía “*late*” (L) que codifica las proteínas estructurales L1 y L2, que son las proteínas de la cápside mayor y menor.
 - L1 se ensambla a viriones o partículas virus-like y cuenta con epítomos de conformación que son reconocibles por el sistema antigénico.
 - L2 actúa en el ensamblaje y encapsulación en el núcleo de la célula huésped.

El genoma viral queda regulado por una porción denominada URR, que regula los genes tempranos y tardíos. Las tres regiones en todo el virus papiloma están separadas por dos locus pA: locus pA temprano y pA tardío.

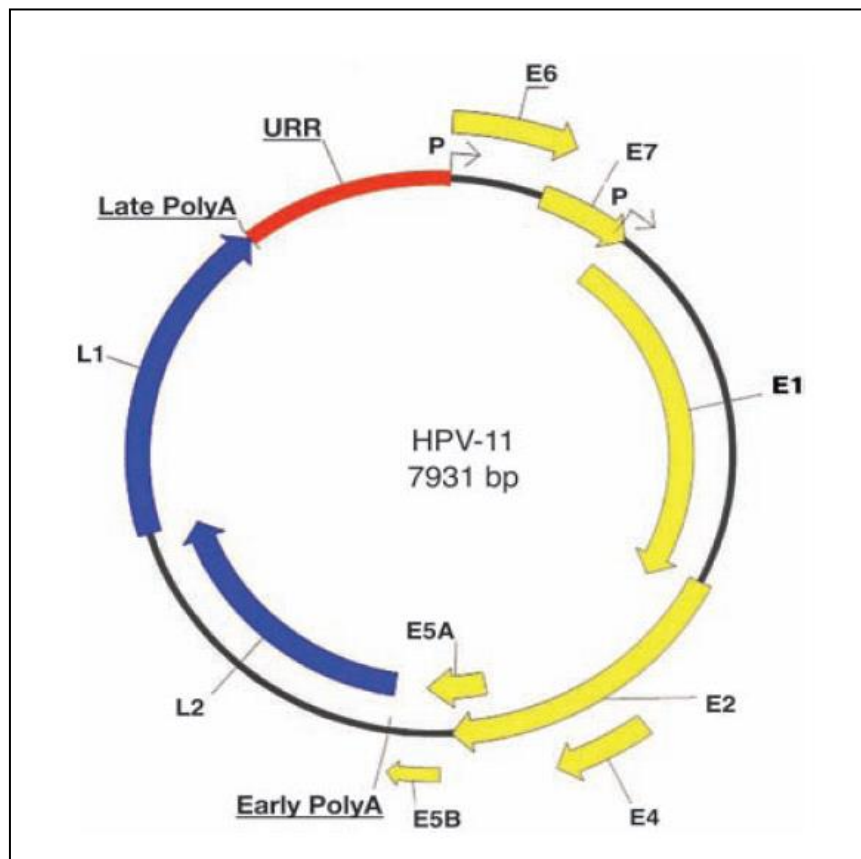


FIGURA 3: Estructura genómica del HPV.

Tipos de virus

El Comité Internacional para la Taxonomía Viral, clasifica a los papilomavirus en diferentes genotipos, subtipos y variantes según el grado de identidad de su

secuencia de nucleótidos en el gen L1. Los genomas del Virus Papiloma bovino tipo 1 y el HPV-1 fueron los primeros en ser secuenciados completamente en 1982 por Chen y cols¹³ y Danos y cols¹⁴. A día de hoy, han sido identificadas al menos 200 cepas de HPV, de las cuales más de 100 están registradas en el Gene Bank.

La mayoría de los HPV pueden clasificarse dentro de tres géneros:

- *Alphapapillomavirus* (α -HPV) que predominan en las mucosas, como la genital y la oral.
- *Betapapillomavirus* (β -HPV) que predominan en la piel.
- *Gamma-papillomavirus* (γ -HPV) que predominan en la piel.

Dentro de estos géneros aparecen especies, y dentro de las especies podemos identificar diferentes tipos. Las especies comparten un 60-70% del genoma, los tipos un 71-89%, los sub-tipos un 90-95%, y las variantes un 95-98%. En la siguiente figura se observa el género α -HPV, y como dentro de este género existen 15 especies, y dentro de cada especie existen los diferentes tipos.

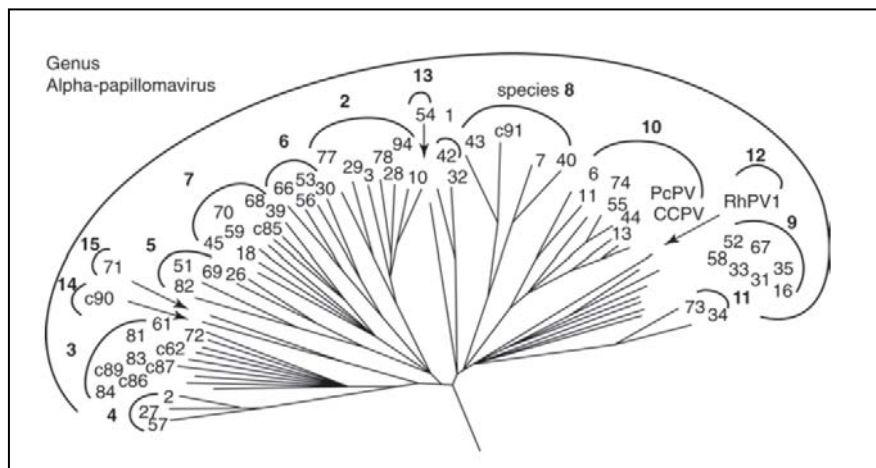


FIGURA 4: Parte del árbol filogenético donde se observa género α -HPV (tomada de Villiers¹¹)

Se han identificado variantes moleculares para casi todos los genotipos de HPV, y estos en su mayoría se agrupan en árboles filogenéticos cuyas ramas o grupos tienen una distribución geográfica específica para algunas de estas variantes.

En el tracto anogenital, uretra, piel, mucosa laringea, mucosa traqueo-bronquial y mucosa oral se han detectado diferentes tipos de HPV. Estos HPV pueden producir diferentes rangos de enfermedad: lesiones benignas (verrugas comunes, verrugas genitales, papilomatosis respiratoria recurrente), lesiones intraepiteliales de bajo y alto grado (SILs), y lesiones malignas. Basándose en la asociación epidemiológica con el cáncer cervical, los HPV se dividen en genotipos de alto riesgo (HPV-16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73 y 82) o de bajo riesgo (HPV-6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 72, 81 y 89). Los tipos de alto riesgo también han sido asociados a carcinomas anogenitales o de orofaringe.

En la siguiente tabla recogemos los tres principales géneros que afectan a los humanos, con sus especies, tipos y características principales.

Género	Especie	Tipo	Características
<i>α-papilomavirus</i>	1	HPV-32, 42	Lesiones benignas mucosa oral o genital
	2	HPV-10, 3, 28, 29, 78, 94	Lesiones cutáneas bajo grado
	3	HPV-61, 72, 81, 83, 84, c62, d62, c86, d86, c87, d87, c89, d89	Lesiones mucosas bajo grado
	4	HPV-2, 27, 57	Verrugas comunes de la piel
	5	HPV-26, 51, 69, 82	Lesiones mucosa alto grado

	6	HPV-53, 30, 56, 66	Lesiones mucosa alto grado
	7	HPV-18, 39, 45, 59, 68, 70, c85, d85	Lesiones mucosa alto grado
	8	HPV-7, 40, 43, c91, d41	Lesiones mucosa alto grado y lesiones cutáneas
	9	HPV-16, 31, 33, 35, 52, 58, 67	Lesiones mucosa alto grado-malignas
	10	HPV-6, 11, 13, 44, 74	Lesiones benignas mucosa
	11	HPV-34	Lesiones mucosas, alto riesgo
	13	HPV-54	Lesiones mucosa de bajo riesgo
	14	HPV-c90, d90	Lesiones mucosa de bajo riesgo
	15	HPV-5	Lesiones mucosa de bajo riesgo
<i>β-papilomavirus</i>	1	HPV-5, 8, 12, 14, 19, 20, 21, 25, 36, 47, 93	Lesiones cutáneas benignas pero se han descrito malignas
	2	HPV-9, 15, 17, 22, 23,37, 38, 80	Lesiones cutáneas
	3	HPV-49, 75, 76	Lesiones cutáneas benignas
	4	HPV-c92, d92	Lesiones cutáneas pre- y malignas

	5	HPV-c96, d96	Lesiones cutáneas pre- y malignas
<i>γ-papilomavirus</i>	1	HPV-4, 65, 95	Lesiones cutáneas
	2	HPV-48	Lesiones cutáneas
	3	HPV-50	Lesiones cutáneas
	4	HPV-60	Lesiones cutáneas
	5	HPV-88	Lesiones cutáneas

Los diferentes tipos de HPV cuentan con numerosas variantes. Las variantes del HPV difieren en menos del 2% en la secuencia nucleótida de L1, pero ligeramente más en la región larga de control (LCR), la cual, por no codificar genes, está menos restringida a producir mutaciones viables¹⁵. El análisis de genes relacionados con la regulación celular y viral del HPV-16, han demostrado variaciones de la secuencia intratipo que pueden alterar sus propiedades biológicas¹⁶. Además, la variación de la secuencia de nucleótidos se usa como una herramienta importante para estudios epidemiológicos de transmisión y persistencia del HPV¹⁷.

Historia natural de la infección HPV

Historia natural de la infección en cérvix

La infección por el HPV es la enfermedad de transmisión sexual más frecuente. Su prevalencia es muy elevada en varones y mujeres sexualmente activos, y evoluciona de forma natural hacia la curación espontánea, la cual se observa en más del 90% de los casos. En la segunda década de la vida se estima una prevalencia del 20-25%, pero en algunos grupos de adolescentes o de mujeres jóvenes la infección llega a afectar hasta a un 70% de los individuos¹⁸. En la tercera década la prevalencia disminuye considerablemente, y a partir de los 35 años se mantiene estable en unos valores próximos al 5%.

Se estima que el volumen de mujeres infectadas por el VHP en el mundo es de alrededor de 300 millones, y unas 490.000 desarrollan cáncer de cuello uterino. A esta causística deberíamos añadir 68.400 cánceres de vulva, vagina, ano, pene y cavidad oral atribuibles al HPV¹⁹.

La mayoría de las infecciones por HPV son subclínicas, detectables sólo por cambios en la citología o colposcopia, o bien latentes, detectables únicamente por análisis del ADN viral.

La siguiente figura esquematiza la progresión de la infección cervical por HPV hasta la aparición del carcinoma invasivo.

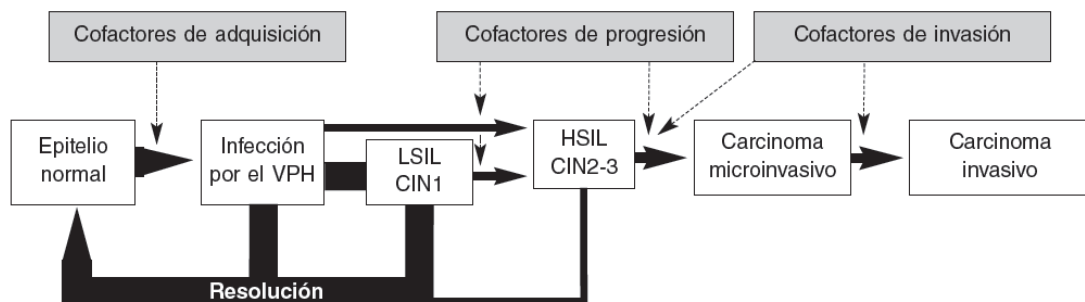


FIGURA 5: Historia natural de la infección cervical del virus del papiloma humano (HPV); CIN: neoplasia intraepitelial; HSIL: lesiones intraepiteliales de alto grado; LSIL: lesiones intraepiteliales de bajo grado¹⁹.

El virus se transmite con facilidad por el contacto sexual, probablemente a través de erosiones mínimas o imperceptibles de la piel o las mucosas. El cuello uterino es especialmente vulnerable al contagio, probablemente a través del epitelio metaplásico de la unión escamoso-cilíndrica. Los HPV aprovechan la dinámica celular para replicarse, y en el cérvix se benefician de la maduración del epitelio metaplásico para expresar sus genes de forma secuencial. En primer lugar, en las capas basales, se expresan los genes tempranos (E1... E7), y después, en las capas superficiales más diferenciadas, sus proteínas tardías (L1 y L2), que forman parte de la cápside y permiten el ensamblaje de nuevas partículas virales que se liberan y repiten el ciclo infeccioso²⁰. Además, el virus puede permanecer latente en las células basales del epitelio.

El cálculo de la duración de la infección por el HPV varía según se tenga en cuenta la infección incidente (de reciente adquisición) o la prevalente (cuyo momento de la adquisición se desconoce), y las posibles reinfecciones. La duración media de la infección por el HPV varía según las diferentes series de entre 6-12 meses²¹ y 2 años²². La persistencia de la infección es mucho menos frecuente que el aclaramiento. No hay acuerdo sobre el tiempo necesario para considerar una infección como persistente. En la práctica, la persistencia se define como la detección del mismo tipo viral en 2 o más determinaciones. La siguiente figura esquematiza la historia natural de la enfermedad a nivel del cérvix²³.

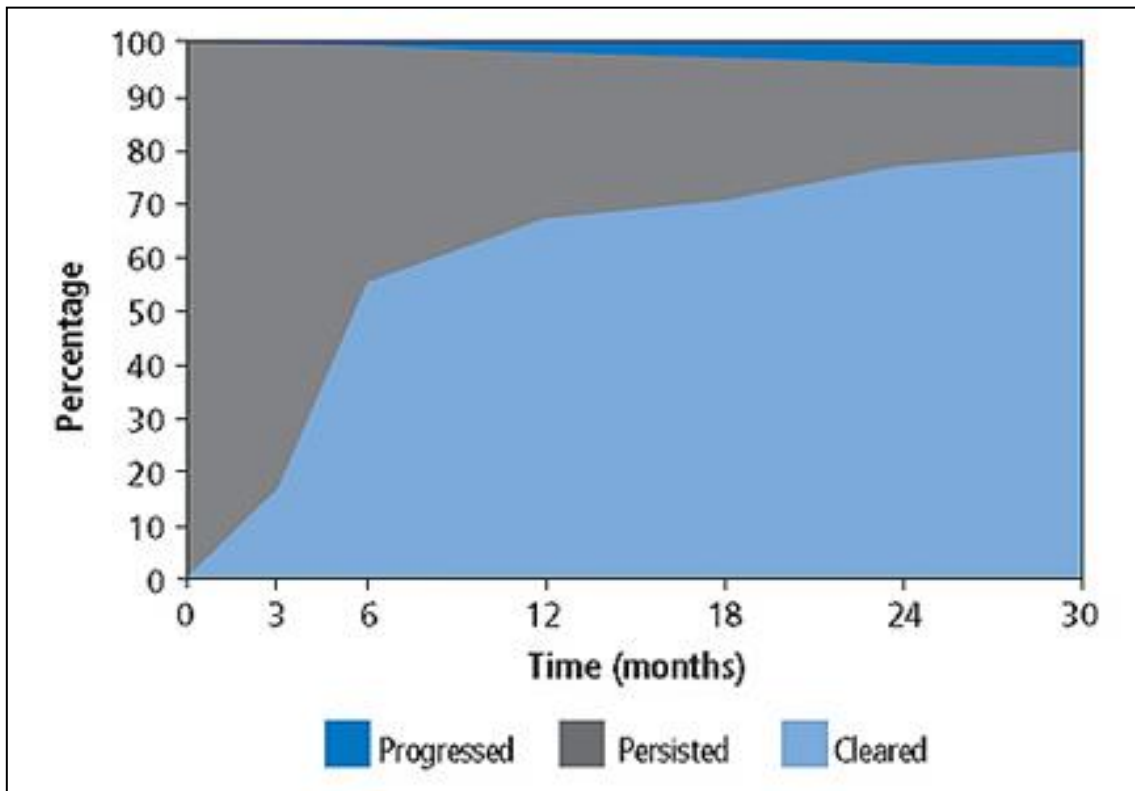


FIGURA 6: Esquema de la historia natural de la enfermedad a nivel del cérvix (tomado de Rodríguez²³)

Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares han evidenciado que la persistencia de la infección por tipos de HPV de alto riesgo es imprescindible para el desarrollo de lesiones intraepiteliales de alto grado con fenotipo neoplásico (HSIL: CIN2 y CIN 3) y cáncer invasivo a nivel del cérvix.

Un 25% de las mujeres con infecciones transitorias por el HPV muestra cambios citopáticos propios de las lesiones intraepiteliales de bajo grado (CIN1) detectables en la citología²⁴. Se ha observado que la lesión de CIN1 remite con particular frecuencia, en especial en adolescentes y mujeres jóvenes, en las que a los 12 meses han remitido el 61% de las lesiones y a los 36 meses el 91%²⁵. La remisión es menor en edades más avanzadas.

En una revisión sobre la historia natural de la CIN, Ostor y cols²⁶ encontraron como las lesiones de CIN1 remiten espontáneamente en el 60% de los casos, persisten en el 30%, progresan a CIN 3 en el 10%, y progresan a invasión en el 1%. En un estudio realizado en 1976 se estimó que un 28-39% de las CIN3 no tratadas progresaban a cáncer invasivo²⁷.

Los análisis virológicos parecen evidenciar que el aclaramiento de la infección por el HPV precede a la remisión de los cambios citológicos²⁸. Al año, la tasa acumulada de aclaramiento de la infección por el HPV de alto riesgo en las mujeres con CIN1 fue del 29%, lo que permitió predecir la regresión de a citología. Todas las mujeres que aclararon la infección por el HPV lo hicieron dentro de los 40 meses de seguimiento, disminuyendo la tasa de aclaramiento a medida que aumenta la gravedad de la lesión intraepitelial.

La infección por el HPV de alto riesgo se considera una causa necesaria, pero no suficiente, de cáncer cervical. La gran mayoría de las mujeres infectadas por tipos de HPV nunca presentará cáncer cervical. Sólo una pequeña fracción progresará a CIN2-3 y eventualmente a cáncer. Esto sugiere que hay otros cofactores que modulan el riesgo de progresión de infección por HPV a cáncer. Estos cofactores se clasifican en virales, genéticos y medioambientales.

1. Cofactores virales de persistencia-progresión

- a. *Genotipo viral.* Los HPV 16 y 18 tienen mayor riesgo de progresión. El 10% de las mujeres con HPV tipos 16 o 18 positivas presentaron un CIN3 a los 3 años, y el 18-20% a los 10 años. Por el contrario, la progresión a CIN3 de las mujeres con otros tipos de HPV de alto riesgo fue del 3%²⁹.
- b. *Variantes del HPV.* Mínimas variaciones en la secuencia de bases del ADN del HPV han permitido identificar variantes genotípicas. Las variantes del HPV16 muestran diferencias geográficas que se han relacionado con distintos riesgos de cáncer. Las variantes no europeas están asociadas con un mayor riesgo³⁰. Se sugiere que las variantes pueden influir en la historia natural de la infección por dos mecanismos: diferencias en su capacidad funcional o evasión del sistema inmunitario del huésped.

- c. *Carga viral*. Es un marcador de infección persistente. Se ha sugerido que una carga viral elevada indica una mayor posibilidad de integración del ADN viral en el genoma del huésped.
- d. *Integración*. La integración del ADN viral en el ADN del huésped parece ser crucial en la transformación maligna. Sin embargo, algunos autores sugieren la idea de que el HPV16 es capaz de inducir la transformación maligna sin que haya integración, lo que indica que seguramente intervienen otros factores para que ocurra esta transformación³¹.
- e. *Coinfección*. Es discutible si la coinfección con otros tipos virales aumenta el riesgo de progresión.

2. Cofactores genéticos de persistencia-progresión.

Las variaciones genéticas individuales de los genes relacionados con la respuesta inmunitaria innata, humoral y celular pueden influir en la persistencia de la infección por el HPV y su progresión a cáncer. En las superficies mucosas, la primera línea de defensa frente a la infección es la respuesta inmunitaria innata, mediada por las células *natural killer* (NK), que induce la apoptosis de las células infectadas por el virus y de las células tumorales. En la regulación de la respuesta inmunitaria celular y humoral intervienen los antígenos del sistema de histocompatibilidad HLA (antígeno leucocitario humano), entre otros. Los genes del sistema HLA han sido los más extensamente investigados. Las moléculas HLA presentan los antígenos extraños a los linfocitos T y, por ello, desempeñan un papel importante en la regulación de la función inmunitaria.

3. Cofactores medioambientales de persistencia-progresión.

- a. *Paridad*. Las mujeres con 3 o 4 embarazos tienen un riesgo 2,6 veces más alto de presentar cáncer que las nulíparas, y las mujeres con 7 o más partos tienen un riesgo 3,8 veces mayor³². El motivo de esta asociación está poco claro. Las posibilidades incluyen factores hormonales asociados con el embarazo, traumatismo cervical en el parto, o mayor persistencia de la zona de transformación exocervical.
- b. *Anticonceptivos hormonales*. Algunas investigaciones indican que hay una relación a largo plazo entre el uso prolongado de anticonceptivos orales y la aparición de cáncer cervical.
- c. *Tabaco*. El tabaquismo es uno de los cofactores ambientales más uniformemente identificados con el riesgo de padecer lesiones precancerosas y cáncer cervical. En mujeres infectadas por el HPV el tabaco es el cofactor más importante de progresión, con un aumento del riesgo de 2-4 veces frente a las no fumadoras. Las pacientes con CIN1 y fumadoras tienen mayor riesgo de desarrollar CIN2-3, mientras que el cese del tabaco se ha asociado con una disminución del tamaño lesional de la CIN.
- d. *Inmunodepresión*. Las pacientes inmunodeprimidas tienen un riesgo aumentado de cáncer genital y anal respecto a las mujeres sanas de la misma edad. Se sabe que la respuesta inmunológica deficiente al HPV predispone a la persistencia de la infección, si bien se desconoce el mecanismo exacto por el que la inmunosupresión aumenta el riesgo de cáncer.
- e. *Infecciones asociadas*. Las mujeres con coinfección por el HPV y otro agente de transmisión sexual, especialmente con el virus de herpes simple tipo 2 (VHS-2), o *Chlamydia trachomatis* parecen tener una mayor probabilidad de presentar cáncer cervical que las mujeres sin coinfección. Probablemente, el motivo esté relacionado con una desregulación de la inmunidad local.

- f. *Nutrición y dieta*. Un metaanálisis de 34 estudios³³ realizados en pacientes con lesiones preinvasivas para valorar la eficacia de las modificaciones de la dieta y de los suplementos dietéticos junto al tratamiento estándar constató la limitada calidad de la mayoría de los trabajos revisados para obtener conclusiones válidas. Además, descartó los posibles beneficios de una modificación de la dieta, en especial del uso de antioxidantes o retinol, para prevenir la progresión de las lesiones premalignas.

4. Cofactores de invasión

La progresión de la neoplasia intraepitelial a cáncer invasivo requiere la expresión de factores angiogénicos que estimulan la proliferación de nuevos vasos. La angiogénesis, inducida por el factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y otras proteínas, como la angiogenina (ANG), es fundamental para el crecimiento del tumor, la invasión del estroma y las metástasis. El inicio de la angiogénesis ocurre ya en la CIN y está asociada con la expresión del VEGF por el epitelio anormal. Se ha sugerido que la expresión de VEGF podría ser un marcador de progresión.

Mecanismos de transmisión. Historia natural de la infección en orofaringe

En comparación con los extensos datos disponibles de la transmisión de las infecciones por HPV por contacto sexual a nivel genital, se conoce poco sobre la transmisión de las infecciones por HPV a nivel de las vías aerodigestivas superiores. Por ejemplo, el periodo de latencia entre la infección y el desarrollo de la enfermedad por HPV es completamente desconocido.

Las prácticas sexuales parecen ser las responsables de la adquisición de la infección de HPV anogenitales en la cavidad oral^{34,35}. El incremento de la incidencia de carcinomas de orofaringe asociados a HPV esta probablemente ligado a los cambios en las prácticas sexuales. El ADN del HPV fue detectado en la orofaringe de mujeres en un porcentaje significativamente mayor, cuando presentaban al mismo tiempo lesiones genitales causadas por HPV³⁶. Según un estudio de Herrero y cols³⁷ la práctica del sexo oral fue 3 veces más frecuentemente en grupos con carcinoma de orofaringe HPV+, que en grupos con carcinoma orofaringe HPV-. Un estudio en sueco³⁸ realizado entre los años 1958 y 1996 estudió de forma secundaria a los maridos de mujeres con carcinomas cervicales y se observó que el riesgo de desarrollar carcinomas de orofaringe en los maridos era significativamente mayor, así como el riesgo en estas mujeres de desarrollar carcinoma de orofaringe también era superior al resto de la población. En un estudio publicado por Hemminki y cols³⁹, se observó como las parejas de las mujeres con cáncer de cuello uterino contaron con una mayor incidencia de carcinoma de orofaringe que la población general. La infección oral por HPV persistente en uno de los cónyuges se asoció con un riesgo diez veces mayor de infección persistente en el otro cónyuge⁴⁰.

El comportamiento sexual se ha asociado con una mayor prevalencia de HPV oral, apoyando la transmisión sexual del virus. Puede ser difícil de diferenciar cuáles son los comportamientos sexuales para transmitir la infección por HPV en la cavidad oral/orofaringe. En estudios transversales, la prevalencia de infección por HPV está fuertemente asociada al número de parejas con las que se practica sexo oral, lo que sugiere que el HPV

puede ser transmitido por sexo oral. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender la frecuencia con que se produce esta transmisión, y si el HPV se puede transmitir a nivel del tracto aerodigestivo superior de otras maneras. Termine y cols⁴¹ en una revisión de los datos publicados en la literatura de la infección oral por HPV en mujeres con infección cervical, estimó una prevalencia de un 18,1%, sin que se pudiese demostrar la asociación con el sexo oral.

Actualmente no está claro si el HPV se puede transmitir casualmente, es decir, sin contacto sexual, a la cavidad oral. Besar en la boca (*french kissing*) se asoció con la prevalencia de HPV oral en un pequeño estudio en hombres⁴², pero no en otros estudios en adultos, por lo que debe ser bien evaluado. La infección es infrecuente en niños⁴³, incluidos los que nacen de madres con infección vaginal por el virus⁴⁴.

Estudios iniciales sobre la historia natural del HPV en las vías aerodigestivas superiores sugieren que la persistencia del HPV es similar a la conocida para la infección por HPV anogenital^{45,46}. Sin embargo, son necesarias más investigaciones para comprender mejor la transmisión de las infecciones orales por HPV, y qué factores están asociados a la persistencia.

Epidemiología de los carcinomas de orofaringe HPV+

El HPV está implicado casi en el 100% de los cánceres de cérvix, en el 66% de los anales, en el 43% de los de localización vaginal y/o vulvar, y en el 44% de los de pene. Desde hace años se conoce la implicación del HPV en los carcinomas de cabeza y cuello, especialmente en los localizados a nivel de la orofaringe, si bien la incidencia de la infección por HPV en este tipo de tumores cuenta con una elevada variabilidad en función de las series consultadas.

Son numerosas las publicaciones que desde los años 1940 y 1950⁴⁷ discuten sobre la malignización de las papilomatosis laríngeas recurrentes a carcinomas escamosos. Por otra parte, en 1975 Newell y cols⁴⁸ observaron en mujeres con el antecedente de carcinoma de cérvix un incremento 5-6 veces superior de desarrollar un carcinoma en la cavidad oral.

Sin embargo, fueron Syrjänen y cols⁴⁹ en 1983 los primeros en demostrar la presencia de antígenos de HPV en lesiones premalignas de la orofaringe, sugiriendo de la posible relación entre la infección por papilomavirus y el carcinoma escamoso a dicho nivel. En 1985 se publicó la primera evidencia de la presencia de HPV en carcinomas infiltrantes de la cavidad oral y la orofaringe, identificándose los genotipos 16,11 y 27 como los asociados a estos tumores⁵⁰.

Durante los siguientes años se fueron confirmando estos datos. Se observó que el porcentaje de pacientes con tumores relacionados con el HPV+ era variable, con un rango de positividad para los carcinomas de orofaringe que oscilaba entre el 25%-60%⁵¹⁻⁵³.

Se han señalado diferencias notables en la penetración de la infección por HPV en los CECC en función de la localización del tumor. Kreimer y cols⁵⁴ publicaron en 2005 una revisión global de la penetración de la infección por HPV en 60 estudios, estableciendo una prevalencia media para los CECC del 25.6%, con unos porcentajes de positividad significativamente superiores en los pacientes con carcinoma de orofaringe, con un porcentaje de positividad del 35.6% frente a los de los pacientes con tumores localizados en la cavidad oral y en la laringe, en los que los porcentajes de positividad fueron del 23.55 y del 24.0% respectivamente.

Estados Unidos:

De acuerdo con estudios de la base de datos poblacional SEER, en Estados Unidos la incidencia anual de cáncer de base de lengua y amígdala en hombres y mujeres de entre 20-44 años se han venido incrementando de forma progresiva entre los años 1973 y 2001, mientras que en otras zonas de la faringe y cavidad oral se mantuvieron estables o incluso disminuyeron⁵⁵.

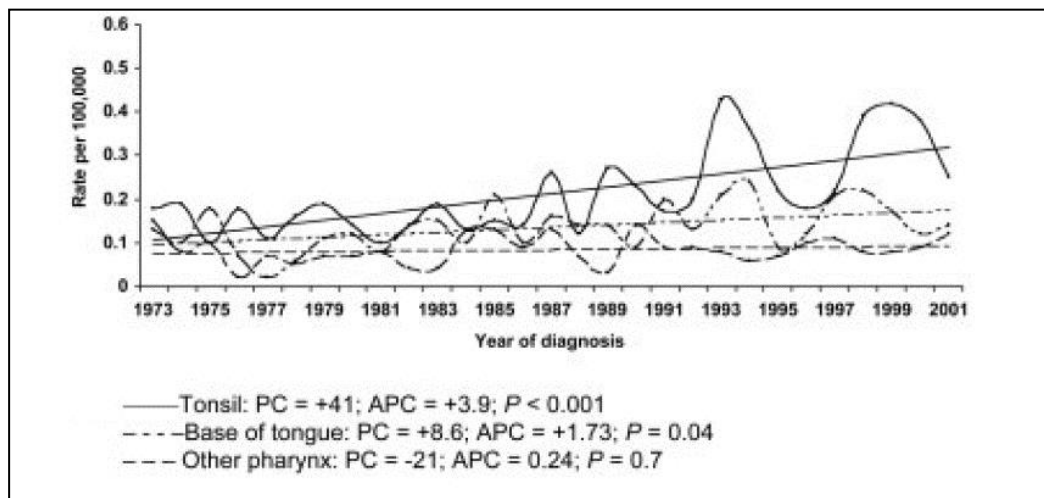


FIGURA 7: Incidencia anual de ca base de amígdala, base de lengua y otras partes de faringe entre los años 1973-2001 (tomada de Shiboski⁵⁵).

Chaturvedi y cols⁵⁶ compararon, a partir de la información de la base de datos SEER, las características epidemiológicas de los tumores relacionados con el HPV de orofaringe con los no relacionados con el virus, en los pacientes diagnosticados en Estados Unidos entre 1973- 2004. Los autores encontraron un incremento en la incidencia de aparición de los tumores en localizaciones relacionadas con el HPV, que incluían la región amigdalal y la base de la lengua, en tanto que las no relacionadas, que incluían el resto de localizaciones de orofaringe y cavidad oral, contaron con una tendencia negativa en su incidencia de aparición, tal como muestra la siguiente figura.

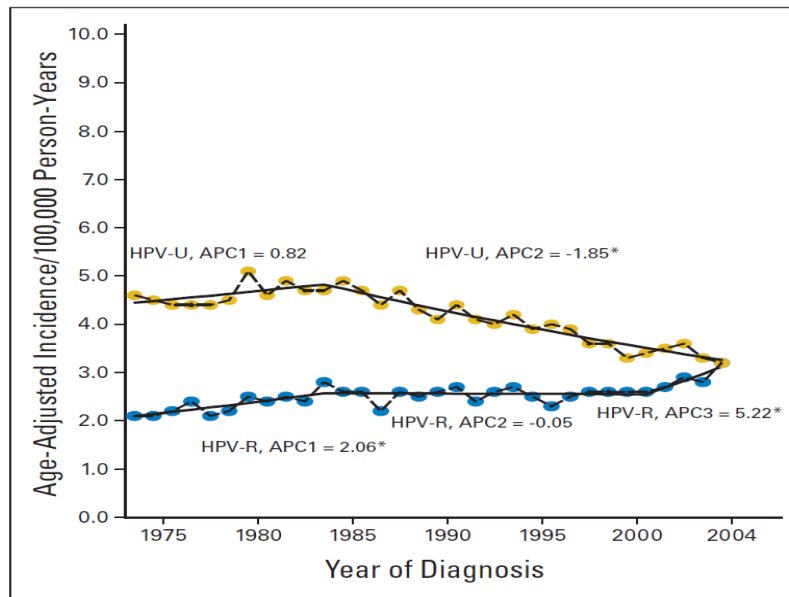


FIGURA 8: Incidencia decreciente de carcinomas localización no relacionados con HPV (HPV-U), e incremento de incidencia de los tumores en localizaciones relacionadas con el HPV (HPV-R) (Tomada de Chaturvedi⁵⁶).

Los pacientes con carcinomas en localizaciones relacionadas con HPV fueron diagnosticados a menor edad que en los pacientes HPV- (edad media al diagnóstico, 61.0 y 63.8 años, respectivamente; $p < .001$).

Ante el aumento de tumores en esta localización, y los estudios que se realizan relacionando el HPV con la patogenia de estos tumores, comienzan a publicar numerosos estudios sobre la positividad del virus en estos tumores observando un aumento significativo.

Recientemente, Stein y cols⁵⁷ han elaborado un meta-análisis a partir de las diferentes series publicadas en la literatura que aportan información relevante a la incidencia de infección por HPV en los Estados Unidos en pacientes con carcinomas de orofaringe. Los autores analizaron los resultados correspondientes a un total de 30 estudios, y pudieron observar un aumento progresivo en la frecuencia de positividad frente al HPV en este tipo de tumores a lo largo del tiempo.

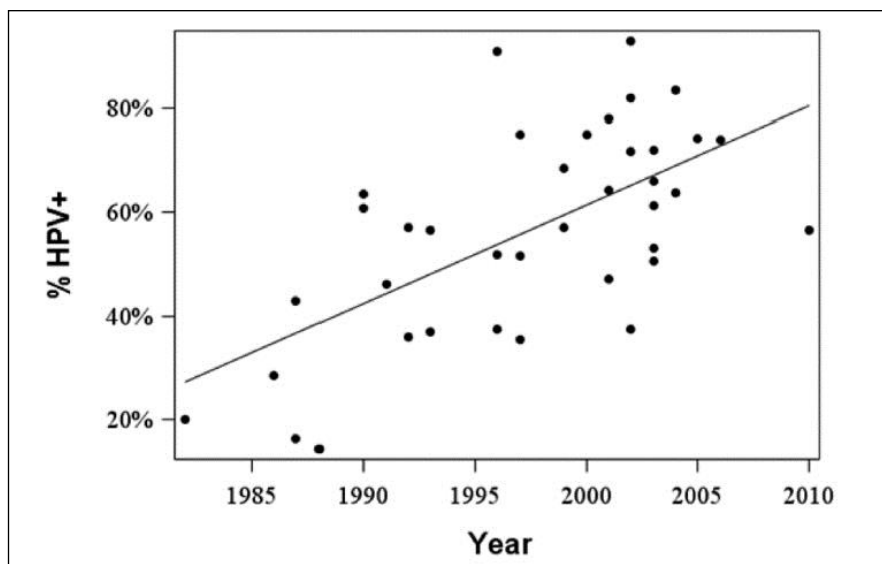


FIGURA 9: Aumento progresivo en la frecuencia de positividad frente al HPV en carcinomas de orofaringe en Estados Unidos (tomada de Stein⁵⁷).

De acuerdo con sus resultados, la frecuencia media de los tumores de orofaringe en los pacientes diagnosticados durante el periodo anterior a 1990 fue del 20.9% (IC 95%: 11.8-37.0%), para los diagnosticados durante el periodo 1990-1999 fue del 51.4% (IC 95%: 45.4-58.2%), y para los diagnosticados a partir del año 2000 alcanzó el 65.4% (IC 95%: 60.5-70.7%)

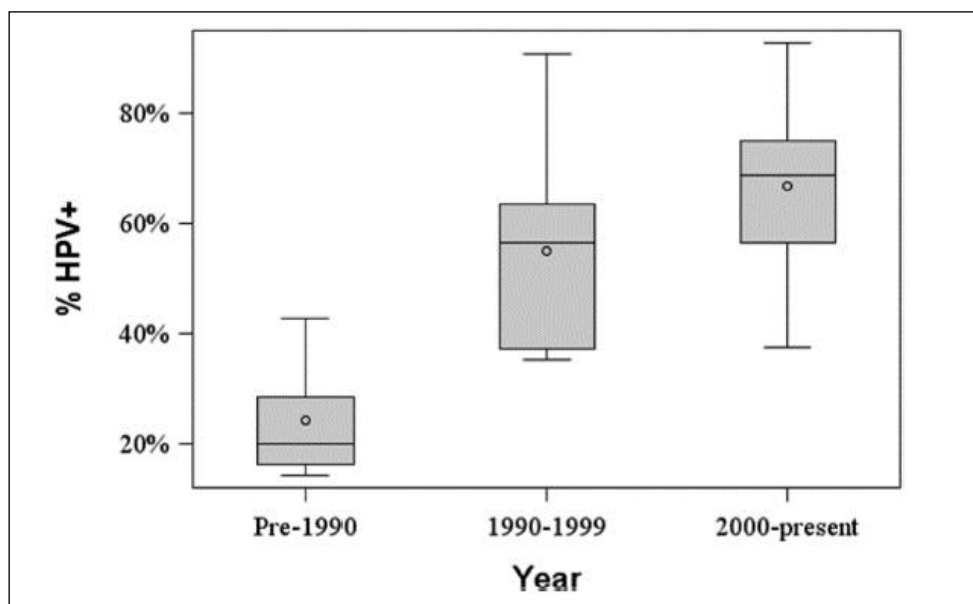


FIGURA 10: Aumento de la frecuencia media de tumores de orofaringe en un meta-analisis (tomada de Stein⁵⁷).

Europa:

La mayoría de estudios publicados realizados en Estados Unidos muestran unos niveles de positividad HPV elevada (>50%) en los carcinomas de orofaringe. A nivel europeo puede apreciarse una tendencia de acuerdo con la cual los países del norte de Europa contaron con una mayor frecuencia de aparición de tumores HPV+, en tanto que esta frecuencia para los países meridionales fue mucho más reducida⁵⁸⁻⁶¹.

Global:

En una revisión de 47 estudios llevada a cabo en el año 2008 para evaluar la frecuencia de tumores de cabeza y cuello HPV+, Termine y cols⁶² encontraron una prevalencia global de carcinomas HPV+ del 38.1% (IC95%: 30.0-a 46.2%). La frecuencia de tumores HPV+ fue superior en aquellos estudios que determinaron la positividad a partir de PCR (39.9%, IC 95%: 30.2-49.8%) que en aquellas que las determinaciones se realizaron en base a hibridación in situ (29.8%, IC 95: 15.8-43.8%).

En una de las revisiones más extensas realizadas hasta el momento es la publicada por Mehanna y cols⁶³ en 2013. Evaluaron un total de 269 estudios realizados entre los años 1970-2010, que incluían información de un total de 19,368 pacientes. De acuerdo con sus resultados, la prevalencia agrupada general de tumores HPV+ en pacientes con carcinomas de orofaringe fue de 47,7% (IC 95%: 42.9–52.5%). El porcentaje de positividad fue incrementando de forma significativa a lo largo del tiempo, del 40.5% para los estudios publicados con anterioridad al año 2000 (n=54), del 64.3% para los publicados entre 2000-2004 (n=22), y del 72.2% para los publicados a partir del año 2005 (n=4). Además, se encontraron diferencias en la prevalencia de los tumores HPV+ según región geográfica. La frecuencia de carcinomas HPV+ en Europa fue del 39.7% (IC 95%: 32.8–47.0%), del 59.9% (IC 95%:54.7–64.9%) en Norte América, y del 32.5% (IC 95%: 23.9–42.4%) en el resto de zonas. La frecuencia de aparición de carcinomas HPV+ se ha venido incrementando de forma significativa en todas las áreas geográficas. Los estudios realizados antes del año 2000 demostraban diferencias significativas en la prevalencia de los

tumores HPV+ entre Norte América y Europa (50.7% vs 35.3%, $P=0.008$), en tanto que los realizados a partir del año 2000 no mostraron diferencias en el porcentaje de tumores HPV+ (69.7% vs 73.1%, $P=0.8$).

En sujetos sanos, por otro lado, diferentes estudios han analizado la presencia de HPV a nivel de la cavidad oral y la orofaringe en sujetos sanos, en un intento de evaluar el grado de penetración de la infección por este virus. Sanders y cols⁶⁴ publicaron en 2012 los resultados de un estudio realizado durante los años 2009-2010 en 4,846 participantes con edades comprendidas entre los 14 y 69 años (edad media 42.0 años), en el que se analizó mediante PCR la presencia de HPV en células epiteliales de la cavidad oral exfoliadas. El ADN de HPV fue detectado en los frotis de cavidad oral en un 7,3% de las personas examinadas (95% IC: 6.0, 8.9%). Los hombres presentaron 3 veces más infección por HPV que las mujeres, y este riesgo no se vio afectado por el nivel de educación, la exposición al tabaco o los hábitos sexuales. Los fumadores tuvieron un riesgo 2,7 veces mayor que los no fumadores, y los fumadores severos (20 paquetes/año), tuvieron un riesgo tres veces mayor. Existió una fuerte relación entre la infección por HPV y el inicio precoz de las relaciones sexuales así como las múltiples parejas sexuales. En el grupo de adultos con una historia de más de 20 parejas sexuales, la posibilidad de infección por HPV era 10 veces mayor que en el grupo de adultos con historia de menos de 3 parejas sexuales. De los 37 serotipos analizados, el HPV-16 fue el más prevalente, apareciendo en un 1.1% de los participantes. Los serotipos 62, 55 y 66 se encontraron en más de un 0,5%.

En un estudio de tipo similar realizado en varones sanos de diferentes países (Estados Unidos, México y Brasil), Kreimer y cols⁶⁵ analizaron un total de 1,688 voluntarios sanos, detectando ADN del HPV en un 4.0% de la muestra (IC 95%: 3.1-5.0%). Los HPV de alto grado aparecieron en un 1.3% de los sujetos, siendo el genotipo HPV-16 el más frecuente. No aparecieron diferencias notables en la prevalencia de infección HPV entre los países estudiados. Apareció una tendencia no significativa hacia el incremento en la prevalencia en la positividad frente al HPV a medida que aumentaba la edad de los pacientes, tal como aparece en la siguiente figura.

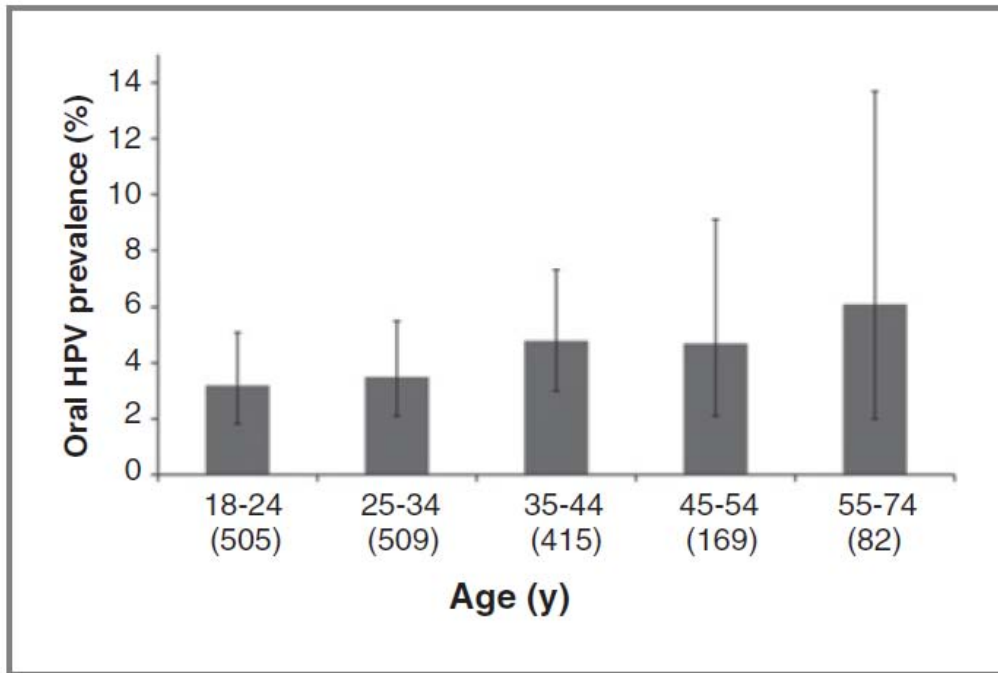


FIGURA 11: *Relación entre prevalencia de HPV y grupos de edad en sujetos sanos (tomada de Kreimer⁶⁵).*

La variable que se relacionó de forma más significativa con la positividad HPV fue el antecedente de tabaquismo. Los pacientes fumadores activos contaron con un riesgo 2.5 veces superior de ser HPV+ (IC 95%: 1.4-4.4), en tanto que no se apreció una relación entre la infección HPV y el antecedente de sexo oral.

Estos datos contrastan con los obtenidos por Palmer y cols⁶⁶, que analizaron mediante PCR muestras provenientes de amigdalectomías realizadas con indicaciones no oncológicas en mas de 3000 pacientes de edades comprendidas entre 0-69 años, durante el periodo 2004-2008. Ninguna de las muestras analizadas mostró la presencia de HPV.

Detección de la infección HPV

Al contrario de lo que observamos en el cáncer de cérvix, en el que el HPV es causa necesaria^{67,68}, un número considerable de los casos de cáncer de orofaringe son ADN/HPV-. Además, la detección de ADN del virus no es suficientemente específica para determinar el papel causal del virus en el cáncer. La detección de ADN viral en un cáncer en el cual el virus no es causa necesaria sino que existen otros factores de riesgo, puede tener dos significados:

- a) Tratarse de una infección transitoria: infección en fase replicativa en la que la infección viral no cuenta con un papel carcinogénico relevante.
- b) Tratarse de una infección con papel oncogénico: la infección viral promueve alteraciones a nivel de la célula huésped que inducen los cambios fenotípicos correspondientes al proceso tumoral.

Es necesario establecer estrategias y algoritmos diagnósticos suficientemente sensibles, específicos, reproducibles y de fácil manejo a nivel clínico, con la finalidad de detectar infecciones por HPV clínicamente relevantes. Este hecho adquiere gran relevancia ya que la detección de HPVs con actividad oncogénica en carcinomas de orofaringe podría ser utilizada en un futuro como herramienta de clasificación diagnóstica, pronóstica y de decisión terapéutica.

Si bien existe un consenso creciente en cuanto a la necesidad de llevar a cabo una determinación rutinaria de la infección por HPV para todos los pacientes con carcinomas de orofaringe, no existe tal consenso en la técnica de análisis a emplear.

Las estrategias de detección varían no sólo en cuanto a la técnica a utilizar, si no también en relación al objeto a determinar. Entre las dianas a detectar se encuentran el ADN o ARN viral, oncoproteínas virales, proteínas celulares o anticuerpos séricos específicos. Los métodos de detección pueden variar ampliamente en función de los laboratorios, reflejando los sesgos y preferencias de los investigadores, así como la relación coste-eficacia de cada una de las técnicas empleadas⁶⁹. La siguiente figura esquematiza el proceso

carcinogénico promovido por el HPV: la infección inicial, integración en el genoma huésped, transcripción de mRNA E6/E7 viral, traducción en oncoproteínas virales, y alteración de la expresión de proteínas celulares incluyendo la sobreexpresión de p16. Cada uno de estos procesos puede ser evaluado mediante diferentes técnicas de laboratorio que se emplean en la detección de la infección HPV en los pacientes con carcinomas de orofaringe.

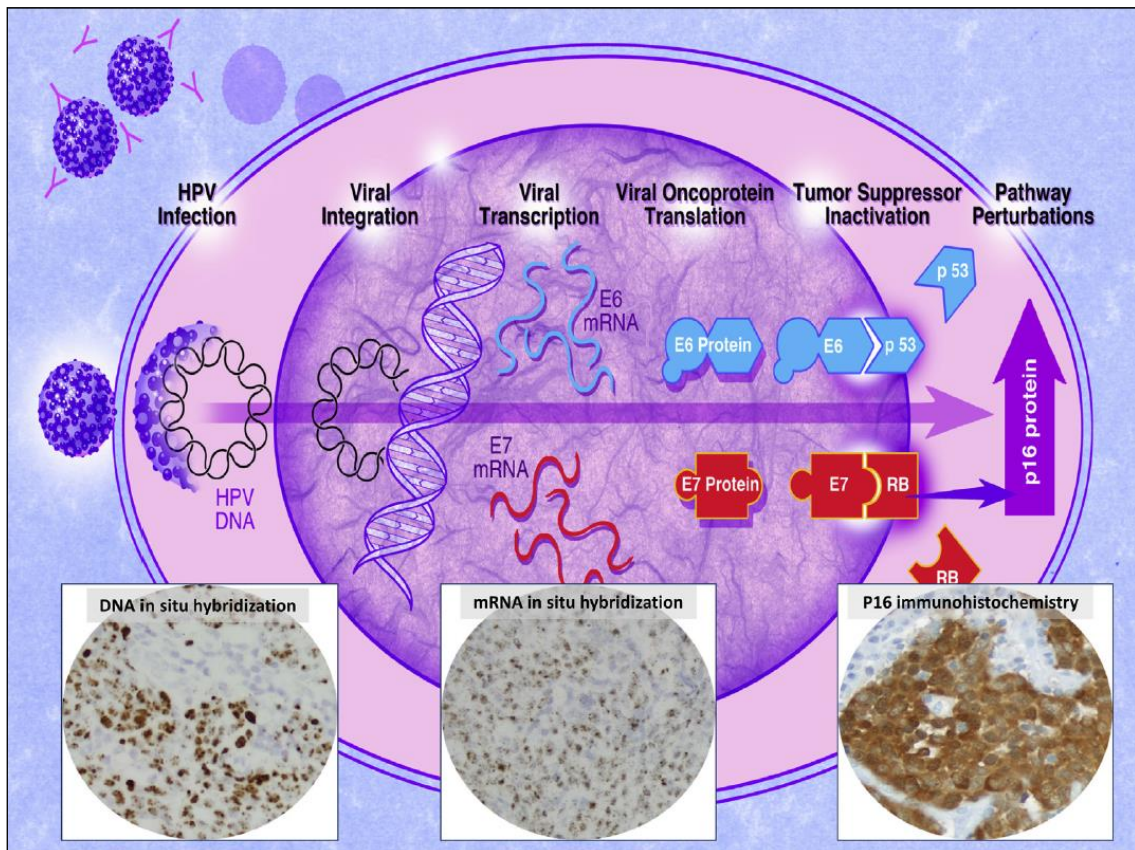
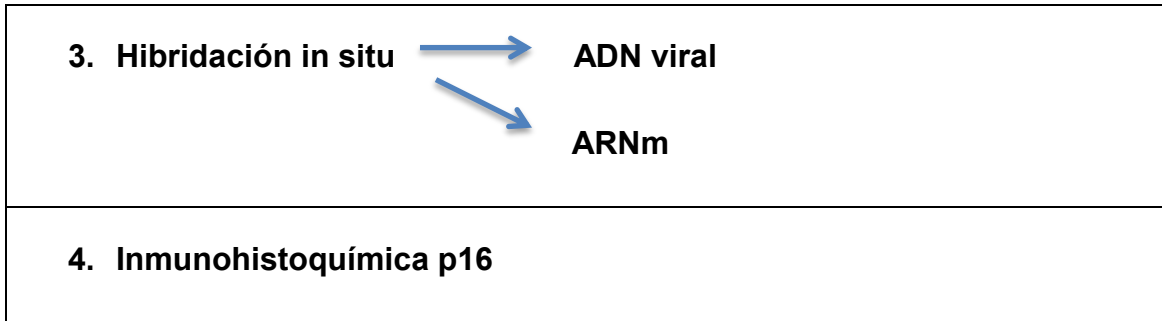


FIGURA 12: Esquema del proceso carcinogénico promovido por el HPV y técnicas de laboratorio que se emplean para la detección de estos procesos (tomado de Westra⁶⁹).

En la siguiente tabla se recoge las técnicas diagnósticas que se explican posteriormente.

1. Evaluación microscópica	
2. PCR	<p>→ ADN viral</p> <p>→ ARNm</p>



Evaluación microscópica rutinaria

Los carcinomas de cabeza y cuello promovidos por la acción del HPV muestran una apariencia microscópica distintiva⁷⁰. A nivel citológico las células tumorales muestran una relación núcleo-citoplasma elevada, un citoplasma sincitial sin puentes intercelulares, y una ausencia de queratinización. Estas características, en ocasiones, proporcionan al tumor un aspecto basaloide o de tumor mal diferenciado. Esta morfología se conserva de forma notable cuando el tumor metastatiza a nivel ganglionar o a distancia.

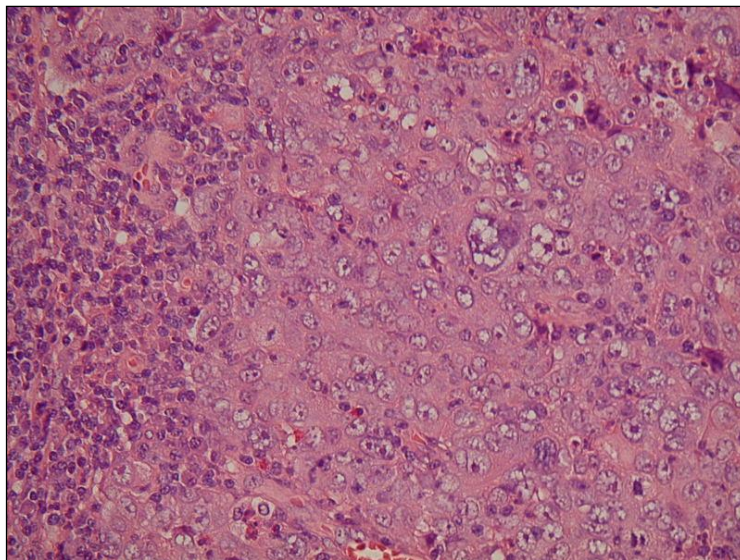


FIGURA 13: *Visión microscópica de una muestra de carcinoma HPV+ de orofaringe⁷⁰.*

Detección del ADN viral con PCR

La amplificación del ADN viral mediante PCR es capaz de amplificar trazas de secuencias del ADN viral en muestras biológicas con un contenido heterogéneo de tipos celulares. Aquellos que abogan por su utilización como método de detección señalan su elevada sensibilidad. Esta técnica cuenta con la capacidad de detectar cantidades mínimas de carga viral. El valor de detectar HPV a unos niveles muy reducidos queda sin embargo contrarrestada por la incapacidad de esta técnica en determinar la relevancia clínica y biológica de la presencia del HPV. Además, las muestras clínicas cuentan con el riesgo de contaminarse de otros especímenes.

Este tipo de determinación no permite distinguir entre un HPV que está actuando como impulsor de la transformación maligna, o un virus silente que no juega un papel en el proceso carcinogénico. Este problema queda puesto de manifiesto por aquellos estudios que han mostrado discordancias entre la detección de ADN viral y la presencia real de E6/7 mRNA, elemento que define las infecciones HPV clínicamente relevantes.

El estudio de la carga viral podría ayudar a diferenciar las infecciones HPV que son clínicamente relevantes. Estudios que han utilizado este método cuantitativo han demostrado una correlación elevada entre la existencia de una carga viral elevada y la expresión de E6/7 mRNA^{71,72}. Uno de los retos en la actualidad es el conseguir una estandarización de las determinaciones cuantitativas basadas en PCR, definiendo de una forma objetiva los umbrales de carga viral relacionados con la actividad carcinogénica del HPV.

Detección de mRNA con PCR

El fin de cualquier estrategia en la detección del HPV reside en su habilidad para reconocer la presencia del HPV y de discernir su potencial como elemento promotor de la carcinogénesis. En ausencia de sondas inmunohistoquímicas específicas para las oncoproteínas virales E6 y E7, la detección de mRNA E6/E7 aparece como la prueba de referencia actual en la evaluación de la infección HPV clínicamente relevante⁷³. Una de las limitaciones de esta técnica es que

requiere de material fresco o congelado para su realización. La posibilidad de utilizar este tipo de determinaciones en material parafinado posibilitará sin duda en un futura su generalización como técnica de detección viral.

Hibridación in situ del ADN viral

La hibridación in situ (HIS) es una técnica de amplificación que utiliza unas sondas de ADN marcadas complementarias a unas secuencias determinadas del ADN viral. Las sondas se unen con el ADN viral de forma específica. La comparación entre HIS y los métodos basados en PCR sugieren que la ADN-HIS podría ser un mejor método de detección en base a consideraciones de orden práctico y biológico: 1) la HIS ha sido optimizada para poder ser llevada a cabo con material parafinado, en tanto que la PCR cuenta con mayor eficiencia al utilizarla sobre tejido fresco; 2) es posible una automatización de las determinaciones de HIS, lo que la hace una técnica de fácil generalización entre diferentes laboratorios; 3) la introducción de varios pasos de amplificación de la señal ha mejorado la sensibilidad de la HIS; 4) el desarrollo de cromógenos no fluorescentes permite la visualización de la hibridación mediante microscopios convencionales, haciendo posible la detección y distribución del HPV en los tejidos.

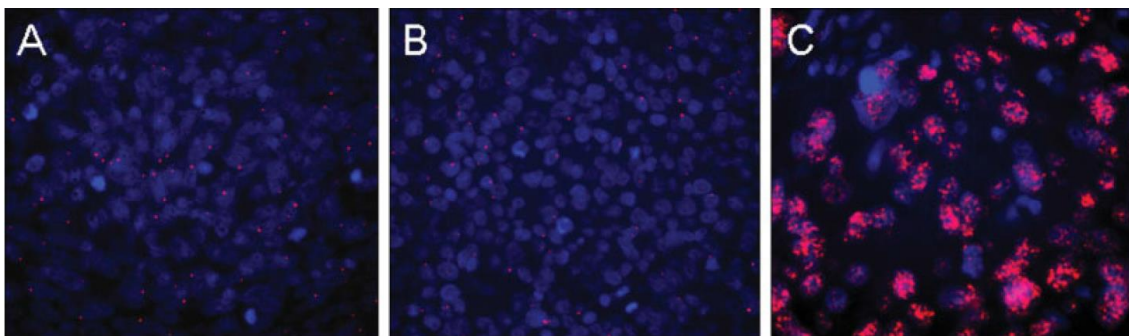


FIGURA 14: *HIS de ADN viral en muestra de COF, a diferentes aumentos.*

Hibridación in situ de ARN

En la actualidad es posible la hibridación de ARN con sondas complementarias al mRNA E6/E7, permitiendo la visualización en tejido procesado de la transcripción viral. La siguiente figura muestra la imagen correspondiente a una muestra de carcinoma de orofaringe HPV+ con una inmunotinción fuertemente positiva frente a p16 (A) y la actividad transcripcional del virus visualizada mediante HIS de ARN (B).

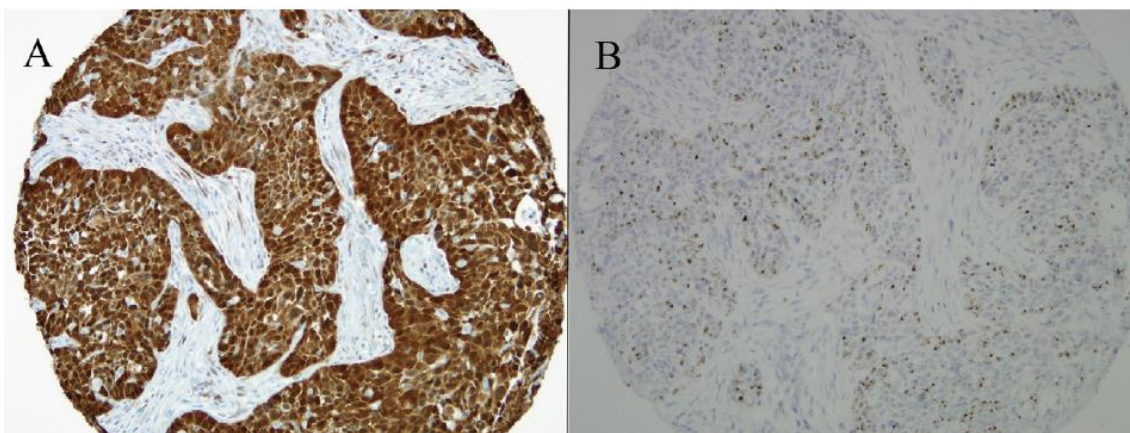


FIGURA 15: Carcinoma orofaringe HPV+ : (A) Inmunotinción positiva frente a p16, (B) Actividad transcripcional del virus visualizada mediante HIS de ARN.

Este método ha demostrado superar la sensibilidad correspondiente a las determinaciones de HIS de ADN viral^{74,75}.

Inmunohistoquímica de p16

Las estrategias utilizadas en la actualidad se basan en el conocimiento de la transformación maligna inducida por el HPV a nivel del epitelio de las vías aerodigestivas superiores⁷⁶. El gen supresor de tumores p16 es un miembro de los inhibidores de ciclo celular INK4 y representa un elemento clave de la vía del retinoblastoma (Rb). El mecanismo carcinogénico promovido por HPV induce un incremento en la expresión de p16. En base a la elevada correlación existente entre la detección de HPV y la expresión de p16, la sobreexpresión de p16 ha pasado a ser considerada como un marcador de infección HPV⁷⁷⁻⁷⁹. En un estudio realizado por Jordan y cols⁸⁰, tanto la inmunohistoquímica de p16 como la HIS mostraron unos niveles de sensibilidad y especificidad altos (96.8% y

83.8% para p16, 88.0% y 94.7% para HIS). La simplicidad, bajo coste y elevada sensibilidad han hecho que la inmunohistoquímica sea en muchos centros considerada como la técnica inicial de estudio de los tumores con sospecha de infección por HPV. Al mismo tiempo, la ausencia de una relación exclusiva y directa entre la integración del ADN viral y la expresión de la p16 debe prevenirnos en considerar la expresión de p16 como el único elemento a considerar en la detección del HPV. En localizaciones como la cavidad oral o la laringe, que no son áreas de afectación preferente por parte del HPV, la probabilidad de que la sobreexpresión de p16 refleje de forma verdadera la presencia de un HPV transcripcionalmente activo es baja^{81,82}.

Para ser verdaderamente útil como marcador subrogado de infección HPV, la interpretación de la inmunohistoquímica de p16 debe tener en cuenta diferentes consideraciones desde un punto de vista histológico, anatómico y clínico. En primer lugar, la p16 es un marcador fiable de afectación HPV cuando existe una tinción intensa presente tanto en el núcleo como en el citoplasma de más de un 70% de las células tumorales. La positividad focal o débil debería ser complementada con otros marcadores de detección del HPV. Además, si bien la sensibilidad y especificidad de la p16 es lo suficientemente elevada para ser considerada como un marcador de infección HPV en los carcinomas escamosos de la orofaringe, no lo es para los tumores localizados en otras regiones anatómicas

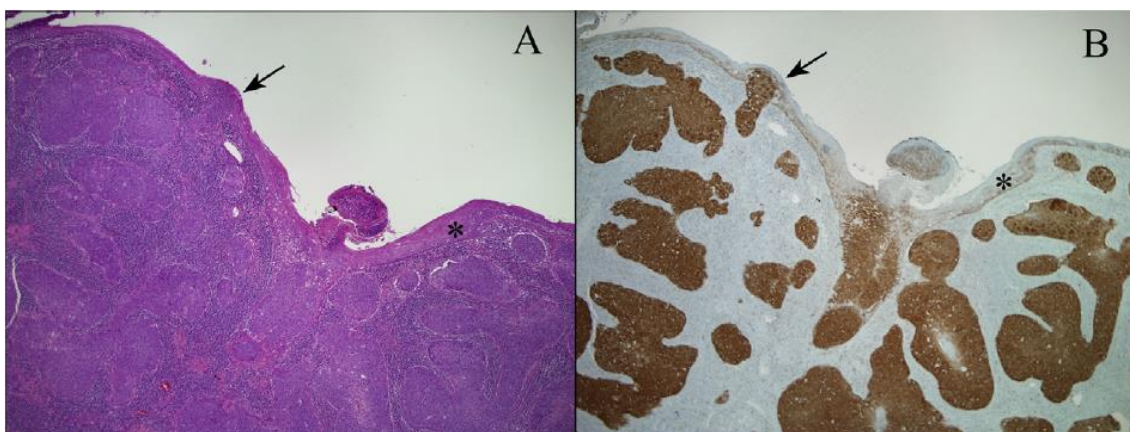
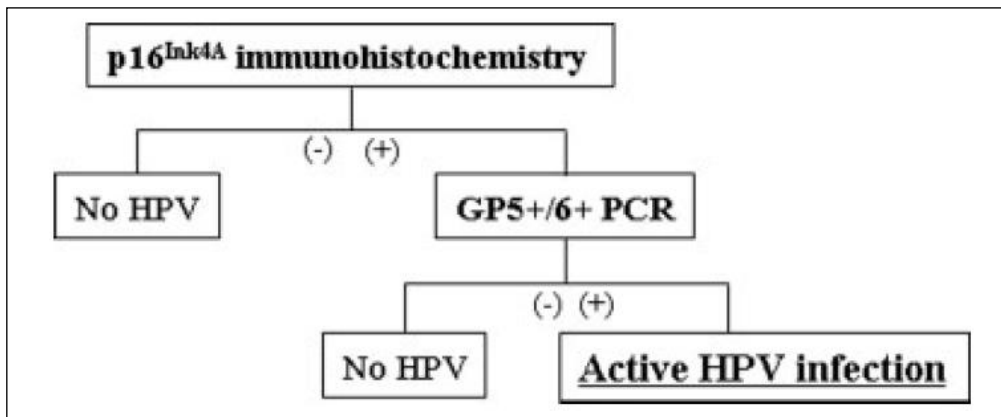


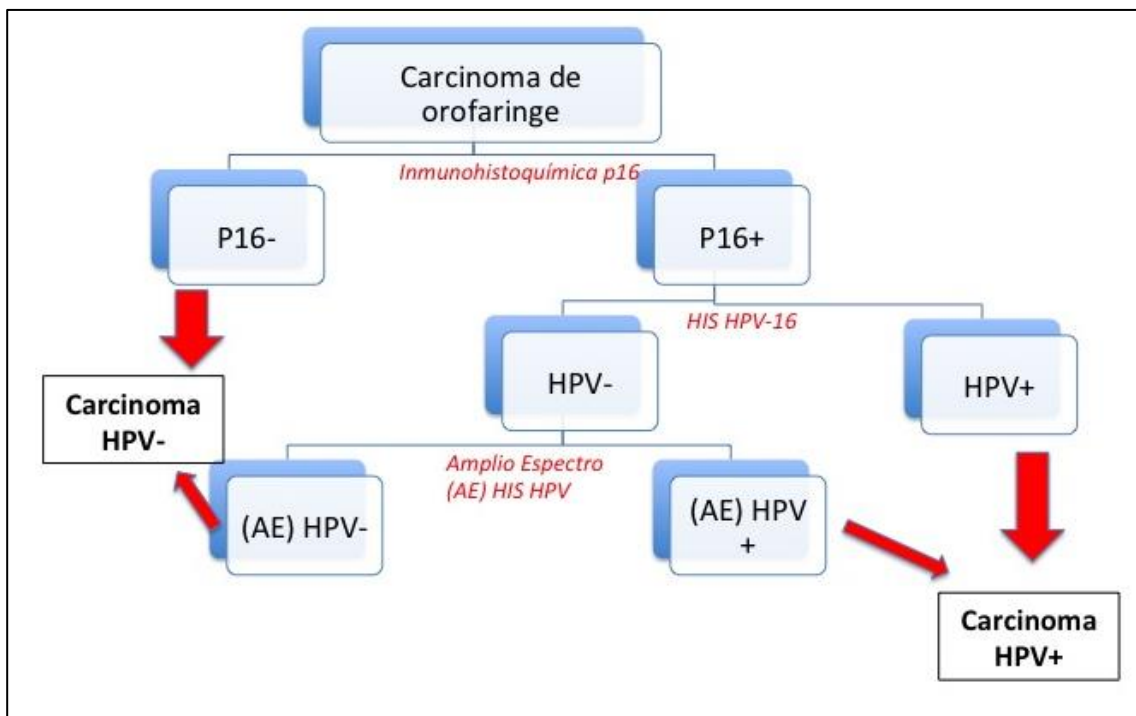
FIGURA 16: *Biopsia carcinoma escamoso orofaríngeo (A) y el mismo con tinción inmunohistoquímica para p16.*

Algoritmos de detección de infección HPV

Smeets y cols⁸³ han propuesto un algoritmo de detección del HPV para pacientes con CECC basado en los resultados obtenidos de forma secuencial en el estudio inmunohistoquímico de la p16 y, para los pacientes p16+, con una caracterización del genotipo viral mediante PCR.



Otros algoritmos proponen los estudios de HIS para validar y genotipar el HPV en los pacientes con carcinomas p16+.



Vacunaciones para prevenir la infección HPV

En el momento actual, existen en el mercado dos vacunas profilácticas frente al HPV. Estas vacunas están compuestas por partículas semejantes a los virus nativos, en inglés “virus like particles” (VLPs). Se trata de estructuras esféricas conformadas a partir de la propiedad de autoensamblaje de la proteína L1, gen estructural inmunógeno mayor de la cápside viral, obtenida por recombinación génica en el laboratorio. Las VLPs son morfológica e inmunogénicamente similares a los viriones nativos, pero carecen de capacidad infectiva, replicativa y oncogénica al no poseer ADN viral. Cada VLP está constituida por 72 pentámeros de L1.

El uso de la vacuna contra el HPV se introdujo en el 2006 en Estados Unidos con la indicación de prevenir la infección viral a nivel del aparato genital femenino. Por el momento no está aprobada la indicación de prevención de la infección a nivel de cavidad oral u orofaringe.

La primera vacuna tetravalente contra los HPV tipo 6, 11, 16 y 18 (Gardasil®, Merck & Co. Inc. Whitehorse Station, NJ, USA) fue aprobada por la FDA en 2006 para niñas y mujeres jóvenes de 9-26 años para prevenir el carcinoma cervical, vaginal y vulvar, y las verrugas anogenitales producidas por HPV. Posteriormente la FDA introdujo una segunda indicación en 2009 para la prevención de las verrugas genitales en hombres de entre 9-26 años. En 2009 se aprobó una vacuna bivalente contra HPV tipo 16 y 18 (Cervarix®, GlaxoSmithKline, Philadelphia, PA, USA) para mujeres de 10-26 años. Ambas vacunas requieren 3 dosis.

De acuerdo con el National Immunization Survey-Teen, de Estados Unidos, el porcentaje de niñas que han recibido al menos una dosis ha aumentado de un 21,1% a un 44,3% entre los años 2007 y 2009⁸⁴. El objetivo en USA a conseguir en 2020 es que un 80% de las niñas entre 13-15 años reciban las 3 dosis de la vacuna del HPV.

En el estado español se introdujo la vacunación frente a HPV dentro del calendario vacunal para la población femenina (niñas de 11-14 años) entre los años 2007-2008 según las comunidades autónomas⁸⁵.

Carcinogénesis inducida por el HPV a nivel orofaríngeo

Clínicamente, los HPV mucosos se clasifican en alto y bajo riesgo a partir del potencial de progresión maligna de las lesiones que originan. A partir del descubrimiento por parte de Harald zur HAusen en el que demostraba que algunos genotipos de HPV se asociaban con la aparición de lesiones premalignas a nivel del cérvix y el desarrollo de carcinomas a dicho nivel^{86,87}, este descubrimiento fue reconocido con la obtención del Premio Nóbel de Medicina en 2008, diferentes estudios epidemiológicos han relacionado la infección por HPV con lesiones tumorales a diferentes niveles.

La siguiente tabla muestra los resultados de un estudio realizado por el Institut Català d'Oncologia y por la OMS en el que se estima la contribución de la infección por HPV de alto riesgo en el desarrollo de carcinomas en diferentes localizaciones del organismo.

Localización	%
Cérvix	>99
Ano	84.2
Vagina	69.9
Pene	47.0
Vulva	44.4
Orofaringe	35.6
Cavidad oral	23.5

Las células de la capa basal del epitelio son las únicas con capacidad de iniciar la infección por HPV, por lo que ésta aparece de forma preferente en zonas sometidas a microtraumatismos o en zonas donde estas células de la capa basal

son más accesibles. La presencia de integrinas $\alpha 6$, $\beta 1$ y $\beta 4$ estarían relacionadas con la unión del HPV a nivel de la capa basal del epitelio.

En el caso del tejido amigdalario, ya sea en la amígdala palatina o en la amígdala lingual, el epitelio de las criptas amigdalares es un epitelio de tipo reticulado, pudiendo exponer las capas profundas a la infección viral. Por otra parte, algunos estudios sugieren que la función inmunológica del tejido amigdalario y la presencia de células relacionadas con esta función inmunológica podrían crear un microambiente favorable a la infección de las células escamosas.

Una vez se ha producido la entrada del virus a nivel de la célula escamosa se requiere de una alteración de los mecanismos inmunitarios que permitan la persistencia de la infección. La actividad $TNF\alpha$ y de IL-1 influye en la capacidad de infección, de manera que una respuesta inmune robusta inducida por dichas citoquinas provocará una superación del proceso infeccioso. A nivel del cérvix, más del 90% mayoría de las mujeres infectadas cuentan con una respuesta inmune que erradica la infección, en tanto que en alrededor de un 10% de casos aparece una infección persistente, y en 5-10/100.000 casos se produce una progresión clínica de la enfermedad.

El virus HPV cuenta con una serie de genes que codifican para proteínas precoces (E), tardías (L) y una región reguladora inicial "URR". Los genes precoces participan en la regulación, promoción y mecanismos de transcripción y replicación del ADN viral, en tanto que las tardías codifican las proteínas de la cápside.

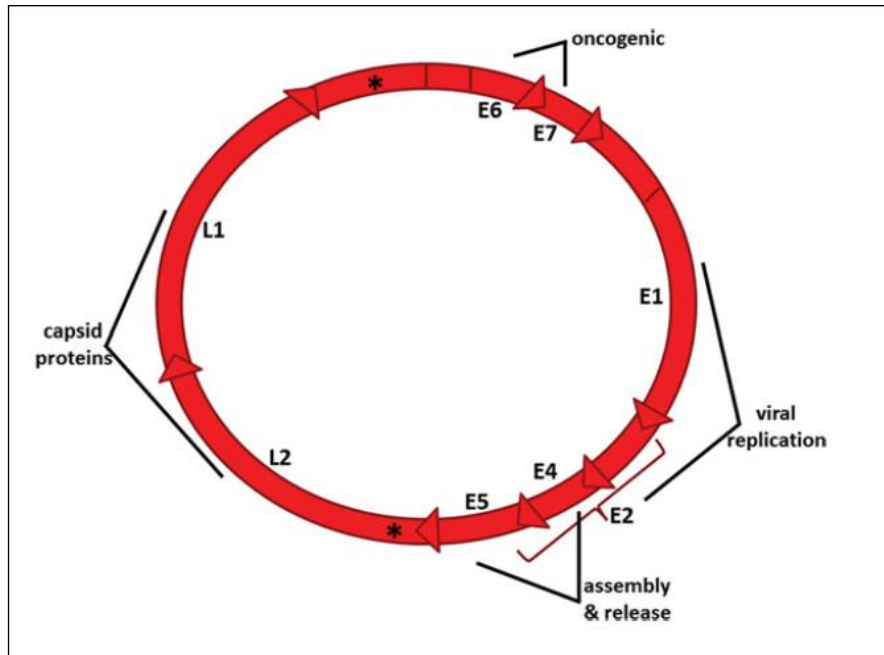


FIGURA 17: Esquema genoma viral del virus papiloma humano.

Proteínas precoces:

- **E1** se trata de una helicasa dependiente de ATP que inicia el mecanismo de replicación viral en cooperación con E2.
- **E2** juega un papel en la regulación de la transcripción de los genes precoces, la replicación del ADN viral, y cuenta con funciones en el mantenimiento del genoma. Actúa sobre la segregación del ADN viral en el momento de la división celular. La expresión de E2 supone una supresión en la transcripción de E6 y E7.
- **E4** actúa modulando la fase tardía del ciclo viral.

Proteínas precoces oncogénicas:

- **E5** es una proteína transmembrana que induce la dimerización independiente del ligando y la activación de proteínas quinasa incluyendo EGFR, e incrementa la expresión de Akt y ERK1/2, lo que lleva al incremento en la expresión de VEGF. Junto con E6, la oncoproteína E5 contribuye a la formación de koilocitos, un tipo celular utilizado en la detección de epitelios infectados por HPV. HPV E5 puede contribuir en las

fases iniciales del proceso de carcinogénesis, pero no es necesario para la progresión hacia la malignización.

- **E6** actúa como un oncogen en los HPV de alto grado. La expresión de E6 aparece como consecuencia de la disrupción/delección de E2, favoreciéndose los mecanismos de integración viral. El proceso de integración del virus aparece como un elemento fundamental en el modelo de carcinoma cervical, en tanto que no está claro su papel en el caso de los carcinomas de orofaringe relacionados con HPV. La integración del virus comporta una anulación de la capacidad represora de E2, resultando en una sobre expresión de E6 y E7. Esta sobre expresión de E6-E7 en los genotipos de alto grado incrementa la proliferación celular y la inestabilidad genética, proporcionando una ventaja a las células infectadas.

E6 se expresa de forma preferente en el núcleo, favoreciendo la inmortalización celular a partir de mecanismos directos e indirectos. E6 forma un complejo trimérico con p53 y una ubiquitin ligasa E3 (E6AP, E6-associated protein), resultando en la degradación del complejo por la acción del proteosoma 26S, lo que reduce de forma drástica la vida media de la p53. E6 inhibe de forma directa la transcripción de la p53. Además, actúa de forma indirecta a través de la regulación epigenética de la p53, y a partir de la activación de la transcripción de TERT (telomerase reverse transcriptase).

- **E7** cuenta igualmente con capacidad oncogénica en los genotipos de alto grado a partir de la regulación del ciclo celular. Las proteínas E7 de genotipos de alto grado se unen a la proteína Rb y provoca una degradación efectiva de la misma a partir de una ubiquitinización dependiente del proteosoma. Como resultado se produce una expresión constitutiva de los genes relacionados con E2F y la progresión celular desde G1 a fase S.

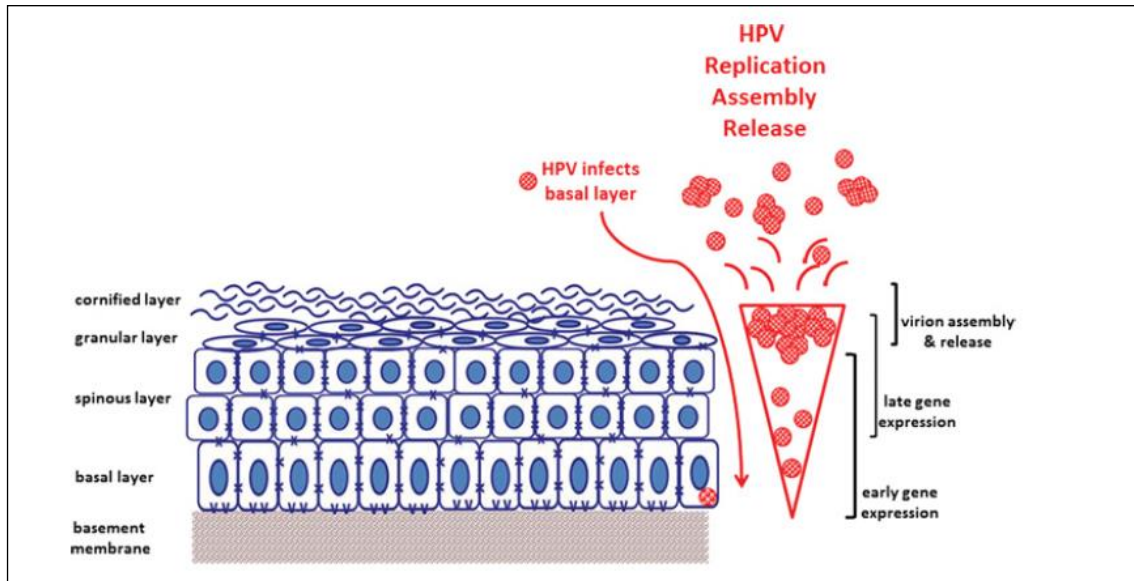


FIGURA 18: Esquema representando el inicio de la infección del HPV en la capa basal del epitelio desde donde progresa a las capas más externas.

La represión de la expresión de E6/E7 de HPV-16 utilizando shRNA vehiculizado mediante retrovirus en células de carcinoma de orofaringe se asocia con una rápida restauración de la actividad p53 y Rb y con una apoptosis masiva⁸⁴.

Alteraciones genéticas en tumores HPV+

Diferentes estudios han evaluado las diferencias a nivel del genoma en relación a la infección HPV. Wilting y cols⁸⁹ compararon las alteraciones cromosómicas aparecidas en carcinomas cervicales HPV+, carcinomas de orofaringe HPV + y HPV-, encontrando un elevado grado de similitud en los tumores HPV+ independientemente de su localización.

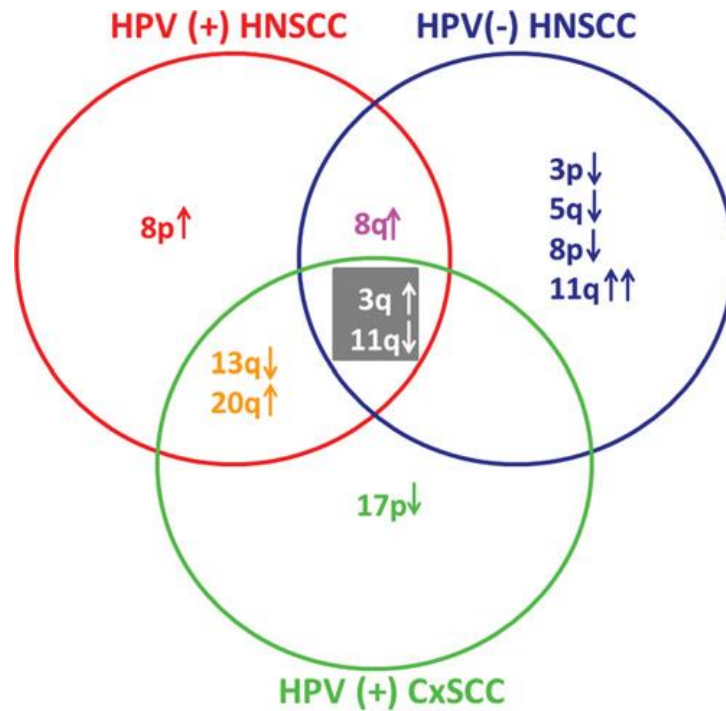


FIGURA 19: Esquema de alteraciones cromosómicas encontradas en carcinomas cervicales HPV+, carcinomas de orofaringe HPV + y HPV- (tomada de Wilting⁸⁹).

Por su parte Martínez y cols⁹⁰ llevaron a cabo un estudio con arrays en muestras de carcinoma de orofaringe, encontrando una expresión diferencial en 59 genes. Entre los sobre expresados en HPV+ aparecieron genes relacionados con la estructura nuclear y meiosis, reparación de ADN y regulación de la transcripción, y entre los infra expresados genes involucrados en la proteólisis y la transducción de señal. Además, aparecieron diferencias en la expresión genética en relación con muestras de mucosa sana.

En otro estudio de características similares desarrollado por Lohavanichbutr y cols⁹¹ se pudo apreciar como no aparecían diferencias notables en los perfiles de expresión en función del estatus HPV en el caso de carcinomas de cavidad oral, en tanto que para los carcinomas de orofaringe sí que aparecían diferencias, particularmente en genes relacionados con la regulación y reparación de ADN, el ciclo celular y la sensibilidad a la radioterapia y la quimioterapia.

Klussman y cols⁹² señalaron los siguientes como genes clave sobreexpresados en los carcinomas de orofaringe HPV+.

Genes sobreexpresados en carcinomas HPV +	Función
CDKN2A (CDK inhibidor 2)	Inhibidor del ciclo celular, producto transcripción de E2F
PCNA (proliferador-antígeno nuclear celular)	Proteína auxiliar ciclo celular para ADN polimerasa
RFC4 (Factor de replicación C4)	Proteína accesoria para ADN pol. Forma parte de complej proteínas de sensor de daño de ADN llamado BASC.
MCM2 (complejo mantenimiento minicromosom 2)	Proteína temprana de fase S involucrada en replicación ADN, probablemente regulada por E2F
MCM3 (complejo mantenimiento minicromosom 3)	Involucrada en replicación ADN, probablemente sirve como helicasa que liga caperona histona con histona puentes H3 -H4 .
CDC7 (ciclo división celular 7)	Preoteín kinase esencial para la fase G1/S de la transcripción y la iniciación de la replicación de ADN.
TYMS (timidilato sintetasa)	Actúan en replicación y reparación de ADN
CCNE2 (Ciclina E2)	Activa CDK2 y y esta involucrada en la síntesis de ADN
USP1 (proteasa ubiquitin específica 1)	Regula negativamente PCNA poliubiquitinación, proceso normalmente inducido por agentes que dañan el ADN
BRG1 (BRM/SWI2-gen 1)	Ivolucrada en mecanismo dependiente de ATP remodelador de cromatina que coincide con el final de la división mitótica.

Finalmente, otros autores han analizado los perfiles de expresión genética teniendo en cuenta el antecedente de tabaquismo además del estatus HPV⁹³, encontrando una expresión diferencial en genes regulados por p53 o E2F.

Una conclusión general a partir de los resultados obtenidos por los diferentes autores es que el número de alteraciones genéticas necesario para conseguir la progresión tumoral en el modelo HPV+ es inferior al requerido en el HPV-.

En dos estudios de secuenciación completa del exoma realizados en unos 100 CECC, la frecuencia de mutaciones para los pacientes con tumores HPV+ fue

aproximadamente la mitad a la correspondiente a la encontrada en tumores HPV- (media de mutaciones de 2.28 mutaciones/Mb versus 4.83 mutaciones/Mb, $p=0.0004$)^{94,95}.

Entre los genes con una expresión diferencial más notable en función del estatus HPV destaca el gen CDKN2A, que codifica para la proteína p16^{INK4a}, que aparece sobre-expresado en los tumores HPV+, de manera que la expresión de la proteína p16 se utiliza como un marcador subrogado de la infección HPV^{96,97}. Otros genes que aparecen sobre-expresados en los tumores HPV+ son p18, TFDP2 y MCM2-6-7^{78,79}.

Recientemente, Mirghani y cols⁹⁸ publicaron los resultados de un estudio en el que se analizó la expresión genómica completa de 30 pacientes con carcinomas de orofaringe, la mitad de los cuales contaban con tumores relacionados con HPV (HPV ADN+/mARN+). De acuerdo con sus resultados, los tumores HPV+ contaban con una expresión diferencial en 224 genes, relacionados con los procesos de respuesta inmune, apoptosis, proliferación /ciclo celular, reparación del ADN, remodelado de la cromatina, diferenciación de los queratinocitos, y transcripción.

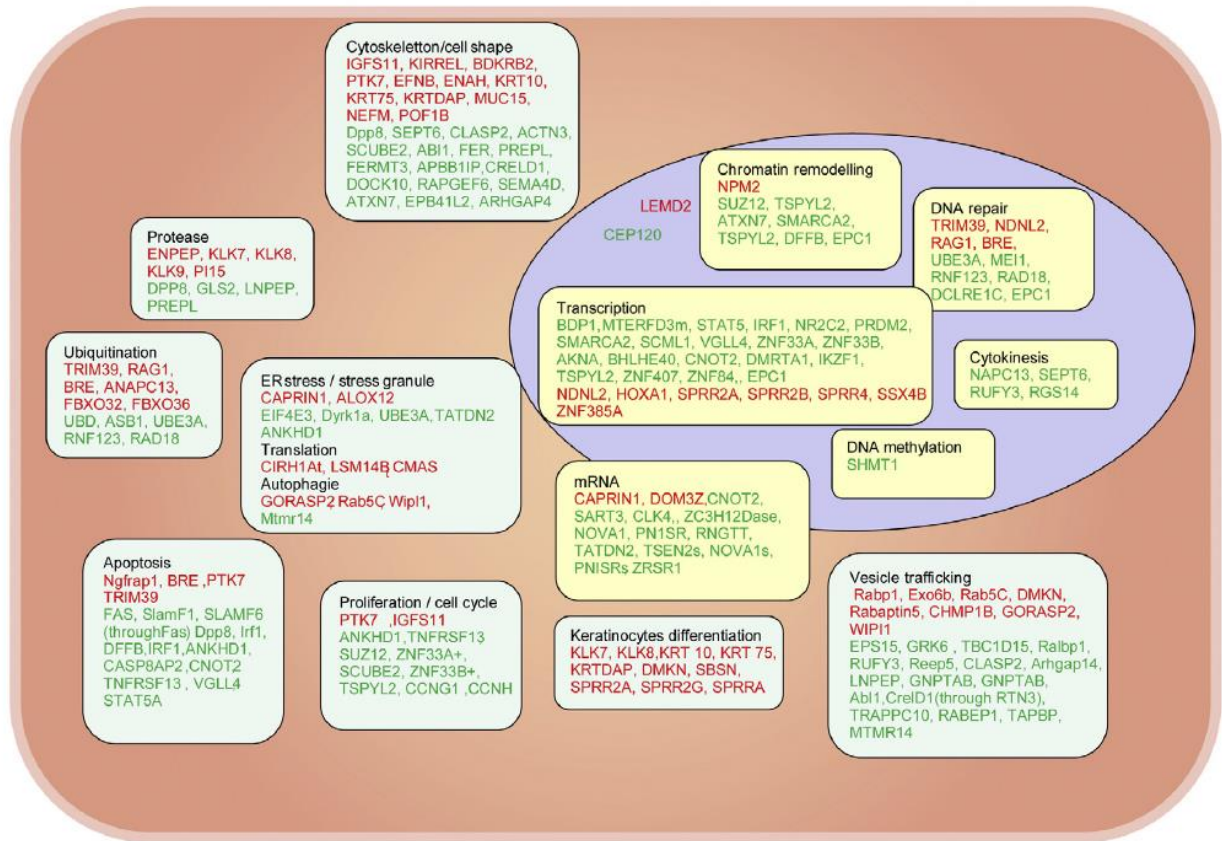


FIGURA 20: Función molecular y celular de los genes con una expresión diferencial en carcinoma de orofaringe HPV+ y HPV- (Verde: genes sobre-expresados en HPV+ y Rojo: genes infra-expresados en HPV+) (tomada de Mirghani⁹⁸).

Cabe destacar que, si bien la expresión de CDKN2A, el gen responsable de la codificación de p16, se encontraba sobre-expresado de forma significativa en los tumores HPV+ ($p < 0.001$), dada la elevada variabilidad en su nivel de expresión, no quedó incluido en la firma genética que definía los tumores HPV+. La siguiente figura muestra los niveles de expresión de CDKN2A de los tumores incluidos en el estudio en función del estatus HPV.

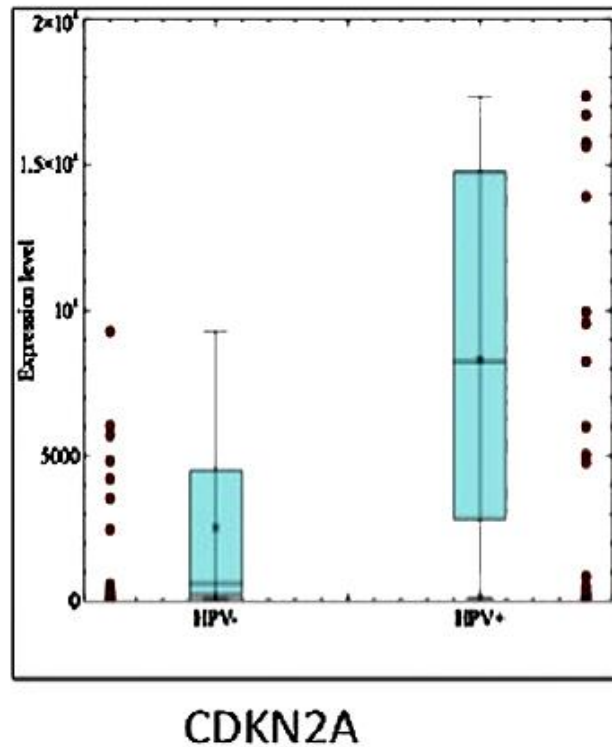


FIGURA 21: Expresión del gen en pacientes HPV- y HPV+ (tomada de Mirghani⁹⁸).

Vía de señalización

Entre los procesos celulares que participan en el proceso carcinogénico en los tumores HPV+ destacan las vías de señalización reguladas por Wnt, PI3K/Akt/mTOR y Notch.

1. La activación canónica de **Wnt** impide la formación del complejo de degradación de la β -catenina, lo que comporta su acumulación y translocación nuclear, y la unión con factores de transcripción como TCF4. Los complejos β -catenina/TCF4 regulan la expresión de genes relacionados con la polaridad celular, la proliferación y la diferenciación, incluyendo c-jun, c-myc y ciclina-D1. Como consecuencia directa de la actividad de E6 y E7, los tumores HPV-16+ cuentan con una activación de la señal Wnt y un acúmulo nuclear de β -catenina⁹⁹. En un modelo de carcinoma de cérvix, se ha podido verificar como la activación de la vía Wnt depende de la represión transcripcional de DKK3 y SFRP2, proteínas que regulan de forma negativa la actividad de esta vía¹⁰⁰.

2. Chun y cols¹⁰¹ analizaron la relación entre la expresión de la vía **PI3K/Akt/mTOR** y su regulador **PTEN** y el estatus HPV en 65 pacientes con carcinomas de orofaringe. El estudio de hibridación mostró la presencia de HPV en 26 de los pacientes analizados. El estudio con RT-PCR demostró la presencia de HPV en 21 de estos los pacientes, siendo el genotipo encontrado con una mayor frecuencia el 16 (19/21, 90.5%). A partir de un estudio inmunohistoquímico, los autores no encontraron una relación entre el estatus HPV y la expresión de proteínas de la vía PI3K/Akt/mTOR. Igualmente, no aparecieron diferencias significativas en los niveles de expresión de p53 en función del HPV. Por el contrario, los pacientes HPV+ contaron con unos niveles de expresión de PTEN significativamente superiores (P=0.037). De acuerdo con el modelo de carcinogénesis “convencional” asociado al consumo de tabaco y alcohol, la pérdida de expresión de PTEN, que cuenta con la capacidad de reprimir el eje PI3K/Akt/mTOR es un hecho frecuente. Según los resultados obtenidos por estos autores, los tumores HPV contarían con un incremento en la expresión de PTEN, específicamente a nivel nuclear, lo que podría ser uno de los elementos que justificase el pronóstico favorable de estos tumores. Por el contrario, Surviladze y cols¹⁰² encontraron que la infección HPV estimula la vía PI3K/Akt/mTOR.
3. Los receptores y ligandos **Notch** actúan regulando la proliferación y diferenciación celular, promoviendo la diferenciación final de los queratinocitos, comportándose como unos supresores de tumores. Se ha demostrado como E6 reprime la transcripción de Notch^{103,104}, lo que justificaría una inactivación de esta vía.

Rampias y cols¹⁰⁵ realizaron un estudio inmunohistoquímico relacionando el estatus HPV/p16 en una cohorte de 102 CECC con la expresión de una batería de 13 biomarcadores relacionados con los procesos de carcinogénesis (E-cadherin, β -catenin, EGFR, MET, STAT3, ERK1/2, pAKT, p13Kp85, p13Kp110, PTEN, p53, Bcl2, NF κ B). Los autores dividieron la cohorte en función de la mediana de expresión de p16 en pacientes con bajo y alto nivel de expresión. De acuerdo con los resultados obtenidos, los tumores con unos niveles de expresión alto de p16 contaron con un incremento significativo de la

expresión de E-cadherin, β -catenin, EGFR, p13Kp110, PTEN, Bcl2, y NF κ B. En un estudio in vitro realizado con dos líneas de CECC HPV+, pudieron demostrar como el silenciamiento de la expresión de E6 y E7 condujo a una inducción de p21 (marcador subrogado de la actividad p53) y de PTEN.

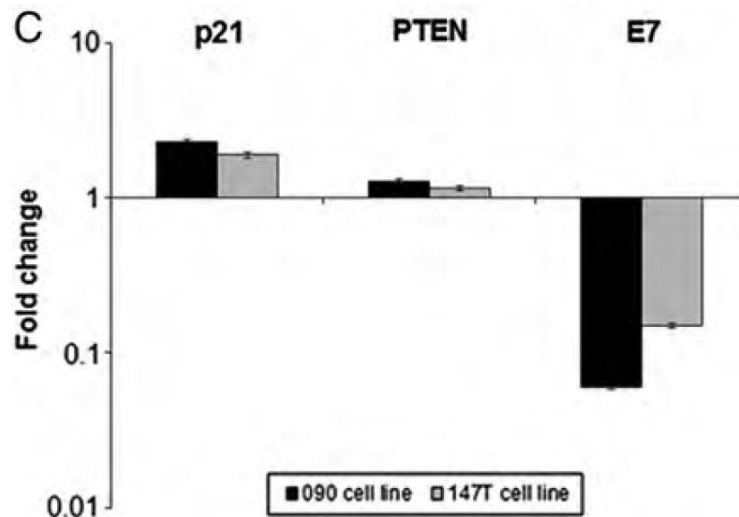


FIGURA 22: Gráfica donde se representa en 2 líneas de CECC HPV+, la supresión de E7 produce inducción de p21 y PTEN consecuente (tomada de Rampias¹⁰⁵).

Zhang y cols¹⁰⁶ analizaron el porcentaje de células con características de stem cell en carcinomas de orofaringe y líneas celulares de CECC en función del estatus HPV. En un estudio realizado con arrays tisulares pudieron demostrar como los pacientes con carcinomas HPV+ contaron con unos niveles de expresión de aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), un marcador indirecto de stem cells, significativamente superior que los pacientes con tumores HPV-, lo que indicaría que los tumores HPV+ contarían con un porcentaje superior de células con características de stem cell. Este hallazgo se verificó con estudios in vitro, según los cuales la expresión de ALDH1 y la eficiencia en la formación de esferas tumorales, otra de las características de las stem cell, fue superior en cultivos celulares derivados de tumores HPV+. De acuerdo con los autores, el nivel de expresión de la ALDH1 carecería de capacidad pronóstica.

Por último, los microRNA son pequeños fragmentos de cadenas simples de ARN que participan en los mecanismos de regulación transcripcional a partir de la

represión o inducción de la degradación del mRNA. Diferentes autores han encontrado que el perfil de expresión correspondiente a los microRNA de líneas celulares de CECC HPV+ difiere de forma significativa del correspondiente a líneas HPV-, y que la actividad del oncogen E6 podría estar relacionada con estas diferencias en los perfiles de expresión de los microRNA^{107,108}.

Relación de la infección HPV con la respuesta al tratamiento con radioterapia y/o quimioterapia

Se ha ido observado que los tumores HPV+ tienen mejor respuesta al tratamiento, por lo que numerosas series ha analizado los resultados según el tratamiento y el estatus HPV.

Gupta y cols¹⁰⁹ estudiaron la radiosensibilidad correspondiente a dos líneas celulares transformadas con HPV-16 (UMSCC47 y UPCI-SCC90) en relación con una línea HPV negativa (SQ20B). Pudieron constatar la existencia de discrepancias en el nivel de radiosensibilidad de las líneas HPV+, con una de las líneas HPV+ notablemente sensible.

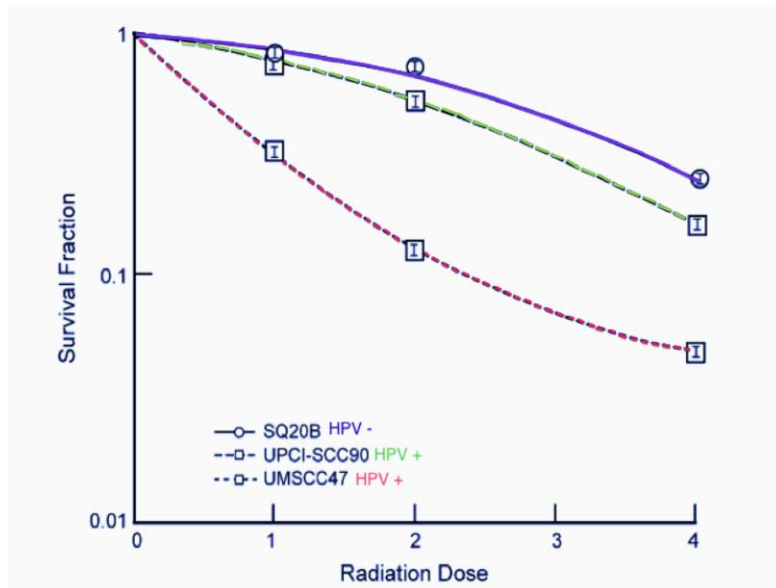


FIGURA 23: Radiosensibilidad en 3 líneas celulares, dos HPV + y una HPV- (tomada de Gupta¹⁰⁹).

Además también observaron que apareció una correlación entre la radiosensibilidad y la actividad de la vía Akt, con una sensibilización similar para las tres líneas estudiadas en función de la inhibición de la actividad Akt.

En otro estudio de radiobiología realizado por Arenz y cols¹¹⁰ se analizó la radiosensibilidad intrínseca de un panel de 8 líneas celulares, incluyendo cuatro líneas HPV+ (UM-SCC-47, UM-SCC 104, UPCI:SCC152, y 93-VU-147T). A partir de los resultados obtenidos con test clonogénicos pudo determinarse que las líneas HPV contaban con una radiosensibilidad superior.

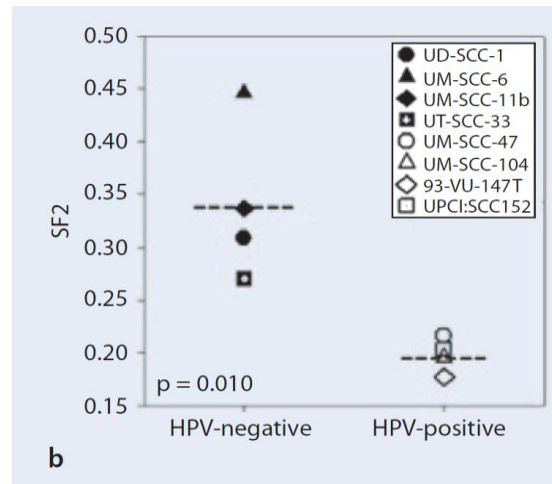


FIGURA 24: Representación de la radiosensibilidad en los grupos HPV – y HPV + (tomada de Arenz¹¹⁰).

El incremento en la sensibilidad a la radioterapia de las líneas HPV+ parecía asociarse a una alteración en la regulación del ciclo celular, con un tránsito más rápido a través de la fase S y un acúmulo en fase G2/M, así como un incremento de la apoptosis asociado a una alteración en los mecanismos de reparación de las roturas de doble cadena.

Sørensen y cols¹¹¹ en un estudio de radiobiología en que compararon líneas celulares HPV- (Fadu, UTSCC5 y UTSCC33) y HPV+ (UMSCC47, UDSCC2 y UPCISSC90), pudieron constatar una mayor radiosensibilidad en las líneas HPV+.

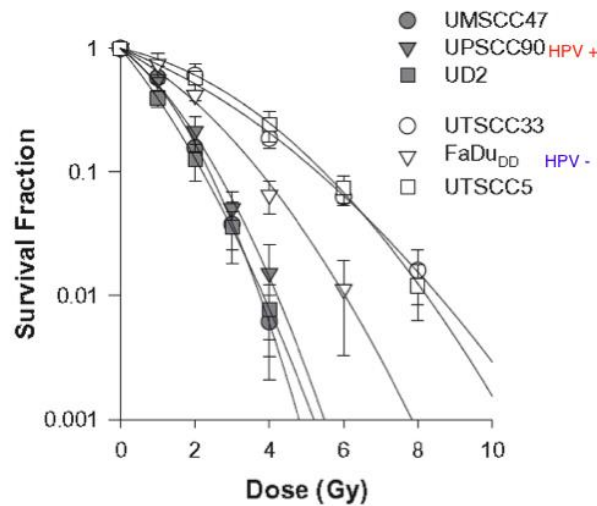


FIGURA 26: Gráfica donde se representa mayor radiosensibilidad en las líneas celulares HPV+ (tomada de Sørensen¹¹¹).

Además los autores pudieron comprobar como la hipoxia incrementaba la expresión de un panel de genes relacionados con la respuesta a la hipoxia de forma independiente al estatus HPV, y como en tratamiento con Nimorazole, un agente radiosensibilizador con actuación sobre áreas hipóxicas, aumentaba de forma significativa la respuesta a la radioterapia para la totalidad de las líneas celulares.

Nagel y cols¹¹² evaluaron la respuesta al tratamiento con radioterapia, cetuximab y cisplatino en un panel de líneas celulares, evaluando la respuesta en función del estatus HPV. Se compararon 4 líneas HPV+ (UM-SCC-47, UD-SCC-2, UPCI-SCC90 y VU-SCC-147) con 14 líneas HPV-. No aparecieron diferencias significativas en la sensibilidad al cetuximab o a la radioterapia en relación con el estatus HPV, en tanto que las líneas HPV+ mostraron una mayor resistencia frente al tratamiento al cisplatino ($p=0.008$), tal como muestra la siguiente imagen.

Introducción

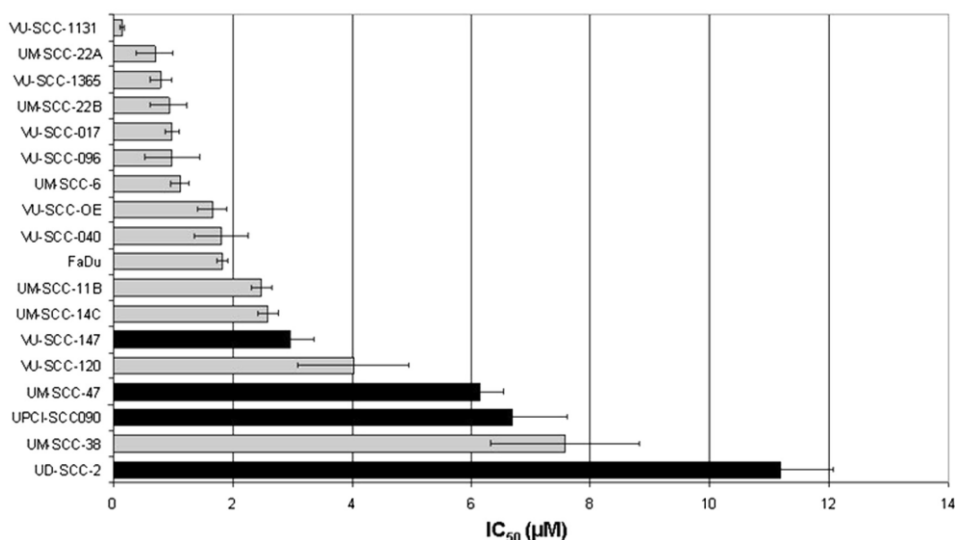


FIGURA 25: Sensibilidad al cisplatino en 14 líneas HPV- (Gris) y en 4 líneas HPV+ (negro), donde se observó mayor resistencia (tomada de Nagel¹¹²).

Las líneas celulares no demostraron diferencias significativas en la capacidad de migración en función de HPV, en tanto que el tiempo de doblaje de la población celular para el conjunto de líneas HPV+ fue significativamente superior ($p=0.025$), si bien esta tasa de crecimiento no se correlacionó con los resultados obtenidos con los diferentes tipos de tratamiento.

Por su parte, Spanos y cols¹¹³ compararon la respuesta a la radioterapia y el cisplatino in vitro e in vivo en un modelo experimental de dos líneas HPV+ (UM-SCC-47 y UPCI-SCC90) con tres líneas HPV-. Las líneas HPV+ fueron ligeramente más resistentes a la radioterapia, en tanto que en un modelo in vivo de ratones inmunocompetentes se invirtió esta tendencia, consiguiéndose una mejor respuesta en los tumores HPV+. La utilización de un modelo de ratón inmunodeficiente (RAG-1, con una anulación de linfocitos T y B) condujo a una disminución significativa de la respuesta al tratamiento con radioterapia en los tumores HPV+, indicando que el sistema inmune aparece como un elemento importante en la respuesta clínica ante este tipo de tumores. El tratamiento previo a con una vacuna frente a E6/E7 resultó también en una disminución en el crecimiento tumoral y un incremento en la supervivencia.

Al comparar la respuesta in vitro con el cisplatino, los autores no encontraron diferencias en relación al estatus HPV. Al utilizar líneas celulares obtenidas de células epiteliales amigdalares normales, las líneas HPV+ contaron con una

mayor resistencia frente al cisplatino. In vivo se reprodujeron los resultados obtenidos con la radioterapia. Los tumores HPV+ contaron con una mayor respuesta, que se anuló al utilizar el modelo de ratón inmunodeficiente.

En función de esta serie de resultados que muestran que intrínsecamente las líneas celulares HPV+ no cuentan con una mejor respuesta frente a los tratamientos administrados, el mejor pronóstico correspondiente a los pacientes HPV+ podría corresponderse con factores dependientes del huésped, entre los que se encontraría la respuesta inmune.

La administración de radioterapia podría incrementar la respuesta inmune frente a antígenos virales a través de diversos mecanismos: incremento en la presentación de antígenos por las células dendríticas, incremento en la migración y penetración de células con capacidad inmune, supresión de las señales inhibitorias dependientes de las células reguladoras de los linfocitos T, disminución de la capacidad angiogénica de los macrófagos asociados al tumor, sobre-regulación de las moléculas del complejo de histocompatibilidad, y la inducción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α con capacidad de revertir la tolerabilidad del microambiente para el desarrollo del tumor¹¹⁴.

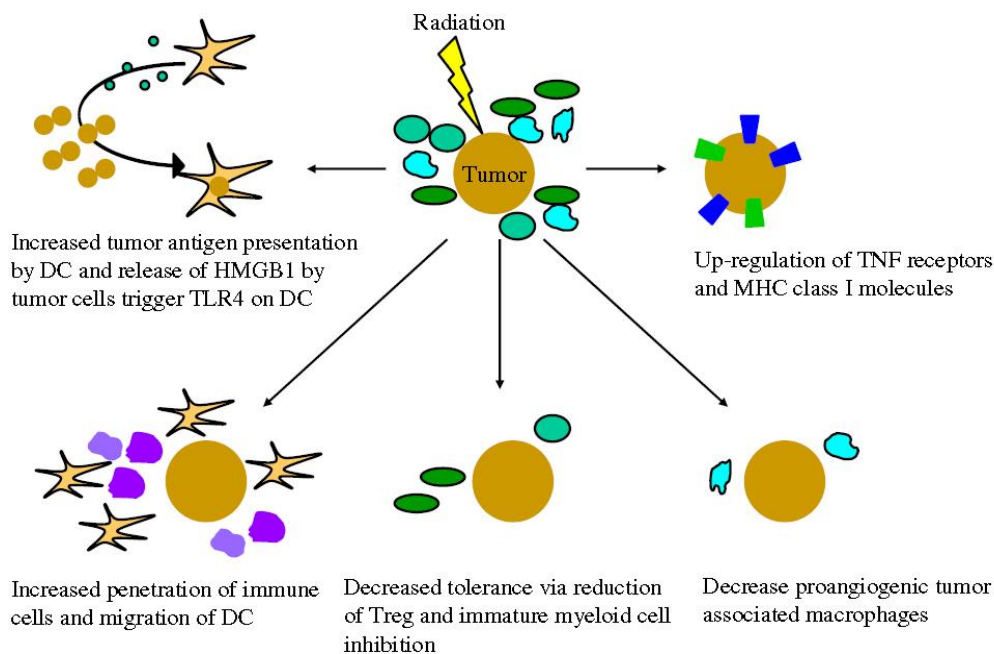


FIGURA 27: Imagen que representa los efectos de la radioterapia (tomada de Vu¹¹⁴).

Sirianni y cols¹¹⁵ evaluaron in vitro la radiosensibilidad de la línea celular HPV+ de carcinoma de orofaringe SCC90 en función del tratamiento previo con cidofovir, un fármaco con actividad antiviral frente a virus ADN a partir de la fragmentación del ADN y la inducción de apoptosis de células infectadas por HPV. De acuerdo con sus resultados, el tratamiento con cidofovir no modificó de forma sustancial la viabilidad de la línea tumoral, en tanto que sí que incrementó de forma significativa la sensibilidad al tratamiento con radioterapia, tal como muestra la siguiente figura.

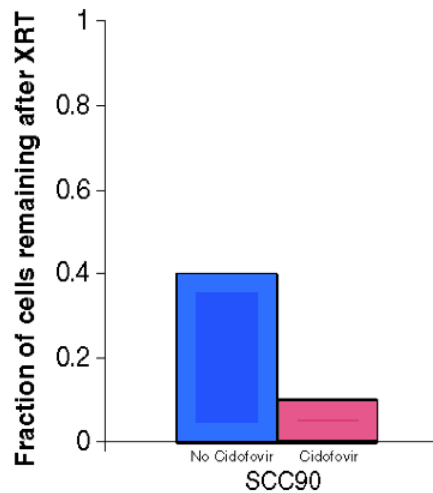


FIGURA 28: Gráfica que representa la radiosensibilidad de carcinomas orofaringe HPV+ en función del tratamiento previo con cidofovir (tomada de Sirianni¹¹⁵).

De acuerdo con sus resultados, el incremento en la sensibilidad a la radioterapia podría corresponderse con una estabilización en la expresión de la p53 inducida por el tratamiento con cidofovir.

Hipótesis y objetivos

Hipótesis

La hipótesis del presente estudio es que se está produciendo un aumento del porcentaje de pacientes HPV+ en los carcinomas de orofaringe diagnosticados y tratados en nuestro centro, y que estos pacientes HPV+ cuentan con unas características epidemiológicas y de respuesta al tratamiento diferentes a las de los pacientes no infectados por el virus (HPV-).

Objetivos

Los objetivos que nos planteamos en el presente proyecto son:

1. Cuantificar el porcentaje de tumores HPV+ y su genotipo en pacientes con carcinomas de orofaringe diagnosticados y tratados en nuestro centro durante el periodo de 1991 a 2012.
2. Estudiar la existencia de tendencias en cuanto a la incidencia de aparición de carcinomas de orofaringe HPV+ a lo largo del periodo de estudio.
3. Evaluar la relación entre la positividad HPV y la edad, el sexo y los antecedentes en los consumos de tabaco y alcohol en los pacientes.
4. Analizar la relación entre la positividad HPV y la extensión de la enfermedad.
5. Investigar la actividad biológica del HPV en los tumores positivos a partir de la determinación de la expresión inmunohistoquímica de la p16 y la expresión mediante PCR de mRNA-E6.
6. Estudiar la relación entre la positividad HPV y el pronóstico de la enfermedad.
7. Valorar la existencia de diferencias en la incidencia de aparición de segundas neoplasias en los pacientes con carcinomas de orofaringe en función del estatus HPV.

Material y métodos

Población de estudio

El presente estudio se realizó a partir de los datos obtenidos de una base de datos oncológica que incluye información epidemiológica, terapéutica y de seguimiento de la totalidad de pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello diagnosticados y tratados en el Hospital de Santa Creu i Sant Pau desde 1985¹¹⁶.

Se analizaron los pacientes con carcinomas de orofaringe tratados durante el periodo de 1991 a 2012. Durante dicho periodo, fueron diagnosticados y tratados un total de 3,945 pacientes con carcinomas escamosos en las diferentes localizaciones cabeza y cuello,

La siguiente tabla muestra la distribución en función de la localización de los CECC diagnosticados durante este periodo de tiempo.

	N	%
Rinofaringe	152	3.9%
Cavidad oral	528	13.4%
Orofaringe	799	20.3%
Hipofaringe	386	9.8%
Laringe	1,828	46.3%
Otros	252	6,3 %
Total	3,945	100%

Los tumores localizados en la orofaringe ocuparon el segundo lugar en frecuencia de aparición tras los de localización laríngea.

Para la realización del presente estudio se requería una muestra histológica del tumor previa a la realización de ningún tipo de tratamiento. Se determinó la disponibilidad de la obtención de dicha muestra tumoral comparando el listado de pacientes con carcinomas de orofaringe con el correspondiente a la base de datos del Servicio de Anatomía Patológica de nuestro centro. Se obtuvo un bloque histológico del tumor en un total de 411 casos. El principal motivo por el cual no se dispuso de una muestra de tumor previa al tratamiento fue que el diagnóstico histológico de la neoplasia fue realizado en otro centro, remitiéndose al paciente al Hospital de San Pau para la realización del tratamiento oncológico.

Los bloques de parafina con las muestras del tumor fueron procesadas en el Institut Català d'Oncologia (ICO) en Bellvitge. En una primera evaluación, se procedió a la obtención de un corte para cada uno de los casos y su tinción con H&E. Esta preparación histológica fue analizada por un patólogo del ICO que comprobó la existencia de tumor en la muestra histológica. En un total de 20 ocasiones el patólogo determinó que el bloque histológico no contaba con tejido tumoral de calidad suficiente para ser incluido en el estudio. Además, los patólogos procedieron a tipificar el tipo de tumor de acuerdo con la siguiente clasificación morfológica:

- Convencional
- Basaloide
- Verrucoso
- Papilar
- Sarcomatoide
- Otros

Finalmente, la base del presente estudio la componen un total de 391 muestras de tumor correspondientes a 391 pacientes con carcinomas escamosos localizados en la orofaringe diagnosticados, y que contaron con una muestra histológica del tumor obtenida de forma previa al tratamiento.

La siguiente tabla compara el sexo, edad, categoría de extensión local (T) y regional (N), y localización del tumor en función de que se hubiese obtenido o no una muestra histológica apta para ser incluido en el presente estudio.

		Incluido	No incluido	P
Sexo	Masculino	354 (49.2%)	365 (50.8%)	0.612
	Femenino	37 (46.3%)	43 (53.8%)	
Edad: media (desviación std)		61.1 (10.8)	59.5 (11.1)	0.041
T	T1-2	195 (54.6%)	162 (45.4%)	<0.0001
	T3-4	196 (44.3%)	246 (55.7%)	
N	N0	191 (57.4%)	142 (42.6%)	<0.0001
	N+	200 (42.9%)	266 (57.1%)	
Localización	Amígdala	179 (49.2%)	185 (50.8%)	0.003
	Paladar	64 (65.3%)	34 (34.7%)	
	Base de lengua	121 (43.7%)	156 (56.3%)	
	Pared posterior	27 (45.0%)	33 (55.0%)	

Apareció una tendencia a incluir en el estudio un mayor porcentaje de pacientes con tumores menos avanzados, con una media de edad ligeramente más elevada y localizados a nivel del paladar.

Además, con la finalidad de obtener una estimación de la penetración del HPV en el resto de localizaciones de cabeza y cuello, se procedió a la evaluación de la presencia de HPV en una muestra aleatoria de 100 pacientes con tumores localizados en cavidad oral, hipofaringe y laringe diagnosticados y tratados en el Hospital de Sant Pau durante el mismo periodo de estudio. El procesamiento de estas muestras fue similar al efectuado con las de los tumores de la orofaringe.

Procesamiento de las muestras

Tras comprobar la idoneidad de la muestra de tumor, se realizaron secciones de los bloques de parafina incluidos en el estudio con microtomo bajo estándares de no-contaminación (se utilizó una sola cuchilla desechable para cada espécimen) y con la técnica de sandwich. Se realizaron al menos 8 cortes de cada bloque de parafina, la primera y últimas secciones se tiñeron con H&E y se utilizaron en la evaluación anatomopatológica (verificación de diagnóstico y evaluación de la adecuación del tejido). Las secciones intermedias se utilizaron para la extracción de ADN y subsiguiente detección y tipificación del HPV y para las determinaciones de inmunohistoquímica. El grosor de cada sección para la extracción de ADN osciló entre 5-8µm.

Procedimientos de extracción de ADN y determinación de HPVs mucosales.

La determinación de HPV se realizó en todos los casos considerados adecuados para procesar tras el examen histopatológico. Para incluir el bloque en el protocolo de evaluación y determinación de HPV se consideró necesario que contuviese células neoplásicas en los dos cortes de H&E (sandwich method). El ADN se extrajo bajo condiciones de no-contaminación siguiendo los protocolos establecidos, y procesado mediante el método de digestión con proteinasa-K. La determinación de HPV se realizó usando PCR con el sistema de primers SPF-10 seguido de DEIA (DNA Enzyme ImmunoAssay). En las muestras HPV ADN DEIA positivas se procedió al genotipado mediante Line Probe Assay LiPA25 (Labo Biomedical Products, Rijswijk, The Netherlands). Los genotipos del HPV detectados por esta prueba fueron: HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 34, 35, 39, 40, 42, 43, 44, 45, 51, 52, 53, 54, 56, 58, 59, 66, 68, 70 y 74. Una selección (5%)

aleatoria de muestras HPV negativas fue re-evaluada para excluir falsos negativos (diluciones del ADN para minimizar el efecto de los inhibidores, evaluación de la positividad por β -globina, entre otras).

Con el objetivo de monitorizar la contaminación potencial de los especímenes obtenidos en su lugar de origen, durante el estudio se incluyeron especímenes control (tejidos no relacionados con el HPV). El laboratorio realizó regularmente controles de la técnica con un laboratorio de referencia (W.Quint-DDL Diagnostic Laboratory, Voorburg, Holanda).

Para los pacientes HPV+, se llevó a cabo una determinación de la expresión de E6*ImRNA, para verificar la existencia de la activación de las vías carcinogénicas relacionadas con la infección viral.

Expresión inmunohistoquímica de pRb, p16, p53, CD1.

El papel oncogénico de los HPVs identificados en el paso anterior se evaluó mediante análisis de patrón de expresión de proteínas: pRb, p16, p53 y CD1. En todos los casos HPV+ se realizaron las cuatro determinaciones de inmunohistoquímica, siguiendo instrucciones del fabricante.

Para cada una de las determinaciones de inmunohistoquímica se llevó a cabo una valoración cualitativa de la calidad del marcador, una valoración del porcentaje de células teñidas (<5%, 5-25%, 26-50%, 51-75%, >75%), una valoración de la intensidad de la tinción (valoración del 0 al 5) y una valoración del patrón de distribución del marcador (0: no tinción; 1: tinción focal o parcheada; 2: tinción difusa o continua). A partir del análisis de los valores anteriores, un patólogo procedió a considerar la expresión de cada una de las proteínas valoradas en el estudio inmunohistoquímico como positiva o negativa.

Datos clínicos

Para cada uno de los pacientes incluidos en el estudio se consideraron las siguientes variables:

- Edad en el momento del diagnóstico del carcinoma de orofaringe
- Año de diagnóstico del tumor
- Sexo
- Consumo de tabaco:
 - No consumo
 - < 20 cigarrillos/día
 - ≥ 20 cigarrillos/día
- Consumo de alcohol
 - No consumo
 - < 80 gr/día
 - ≥ 80 gr/día
- Estado general medido con el índice de Karnofsky
- Grado histológico del tumor
 - bien diferenciado
 - moderadamente diferenciado
 - mal diferenciado
- Localización del tumor
 - amígdala
 - úvula y paladar blando
 - base de lengua- valécula
 - pared posterior de orofaringe
- Categoría de extensión local (T)
- Categoría de extensión regional (N)
- Tratamiento realizado a nivel local
 - no tratamiento (tratado en otro centro)
 - tratamiento paliativo
 - radioterapia
 - quimio-radioterapia
 - cirugía±radioterapia

- Tratamiento realizado a nivel regional
 - no tratamiento (tratado en otro centro)
 - tratamiento paliativo
 - radioterapia
 - quimio-radioterapia
 - cirugía±radioterapia
- Control local de la enfermedad
- Control regional de la enfermedad
- Control a distancia de la enfermedad
- Antecedente de neoplasia previa / aparición de segunda neoplasia
- Estatus del paciente en el momento del cierre del estudio
 - no evidencia de tumor orofaríngeo
 - vivo con tumor orofaríngeo
 - fallecido como consecuencia del tumor orofaríngeo
 - fallecido como consecuencia de causa ajena al tumor orofaríngeo

Estudio estadístico

Para las variables consideradas en el presente estudio se llevó a cabo un análisis descriptivo (frecuencia en el caso de las variables categóricas y medidas de tendencia central en las variables continuas).

Para el análisis estadístico se utilizaron los siguientes test:

- ✓ Test de Chi-cuadrado o prueba exacta de Fisher para el análisis de las tablas de contingencia en la valoración de variables categóricas.
- ✓ Student-t test en la comparación de medias de variables continuas para dos grupos independientes.
- ✓ Cálculo de las curvas de supervivencia mediante el método actuarial de Kaplan-Meier. Para la comparación de curvas de supervivencia se utilizó el test log-rank.
- ✓ Modelo de regresión de riesgos proporcionales de Cox para el análisis multivariante.

Esta parte del análisis estadístico se llevó a cabo con la el programa SPSS versión 17.0.

La evaluación de las tendencias en el porcentaje de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ se realizó con el programa Joint Point Regression Program Version 4.1.1 (Statistical Research and Applications Branch, National Cancer Institute), un programa de acceso libre para análisis estadístico obtenido de <http://srab.cancer.gov/jointpoint>. Este software analiza los datos de tendencias y los ajusta de acuerdo con el modelo de puntos de inflexión que mejor se ajusta a los datos aportados utilizando como test de significación el método de permutación de Monte Carlo. Se ofrece como resultado una representación gráfica de las rectas de regresión adaptadas a las tendencias existentes entre los datos, con los puntos de inflexión en caso de que existiesen modificaciones en las tendencias a lo largo del tiempo, con una evaluación del mejor modelo ajustado a los datos utilizados en el análisis. La cuantificación de las tendencias se realizó mediante el cálculo del porcentaje de cambio anual (annual Percentage rate change-APC), que representa la variación porcentual en la tasa de frecuencias correspondiente a una año respecto a la del año anterior. Se

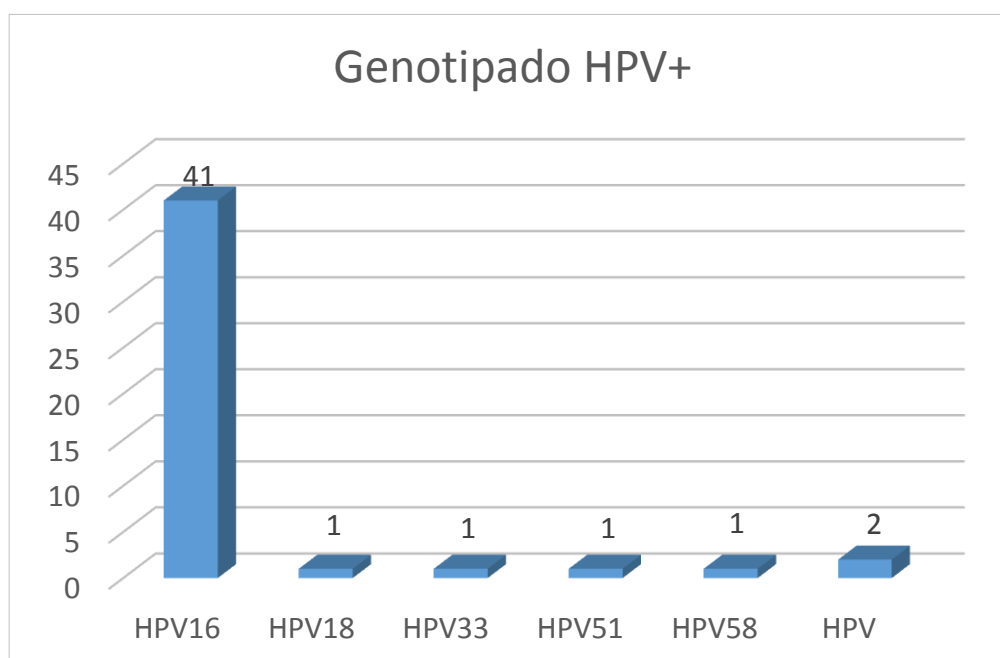
trata de una medida relativa, por lo que puede compararse de forma independiente a la magnitud de la población estudiada. El programa utilizado por el Joinpoint Regression Program utiliza criterios estadísticos para determinar cómo y cuándo se producen variaciones significativas en las cifras de APC a lo largo del tiempo. Debe tenerse en cuenta que la significación del valor del APC dependerá tanto de las modificaciones existentes en la tendencia dentro del intervalo analizado, como de la duración de dicho intervalo.

Resultados

Resultados de las determinaciones de laboratorio

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, la penetración de HPV en la muestra de pacientes estudiada fue del 12.0%. Un total de 47 pacientes contaron con carcinomas que demostraron la presencia de ADN del HPV.

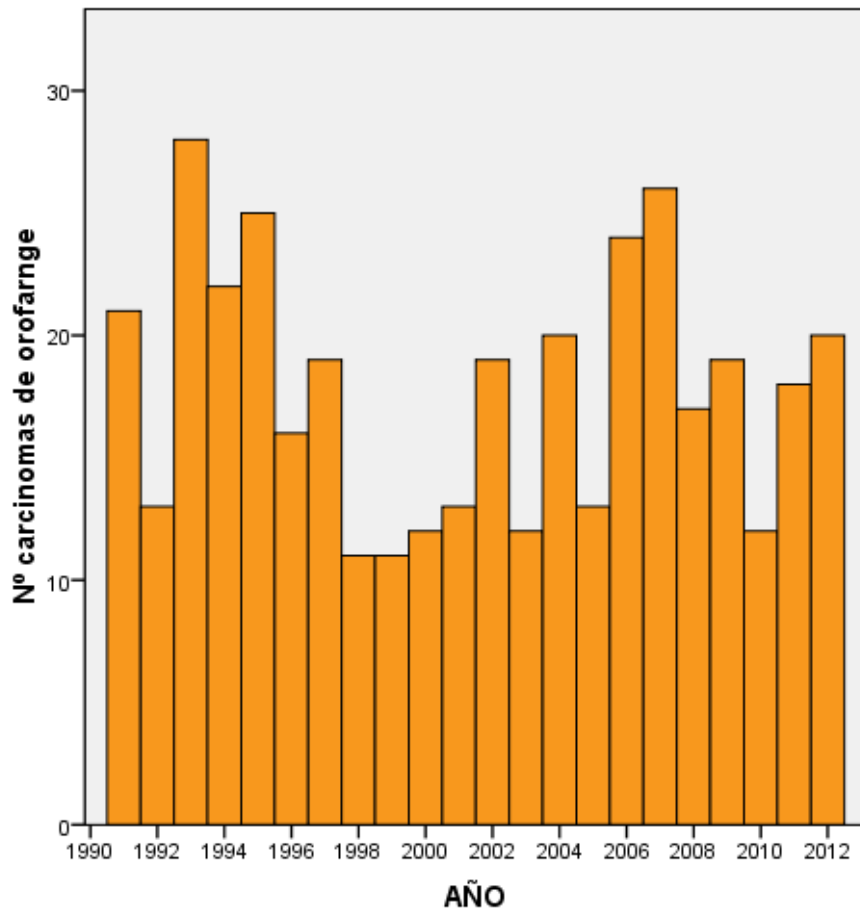
En todas las ocasiones la infección por HPV fue por un único genotipo, sin que apareciesen casos con infección múltiple. La siguiente gráfica muestra la distribución de los genotipos correspondientes a los casos HPV+. En 2 ocasiones la calidad de la muestra obtenida no permitió determinar de forma específica el genotipo correspondiente a la infección HPV.



Una gran mayoría de los casos HPV+ (41/47, 87.2%) lo fueron por el genotipo de alto grado HPV16.

Resultados

El promedio anual de casos de carcinoma de orofaringe incluidos en el estudio fue de 17.7 casos (mediana 18.5) con una desviación estándar de 5.2 casos. La siguiente gráfica representa la distribución de casos incluidos a lo largo del periodo de estudio.

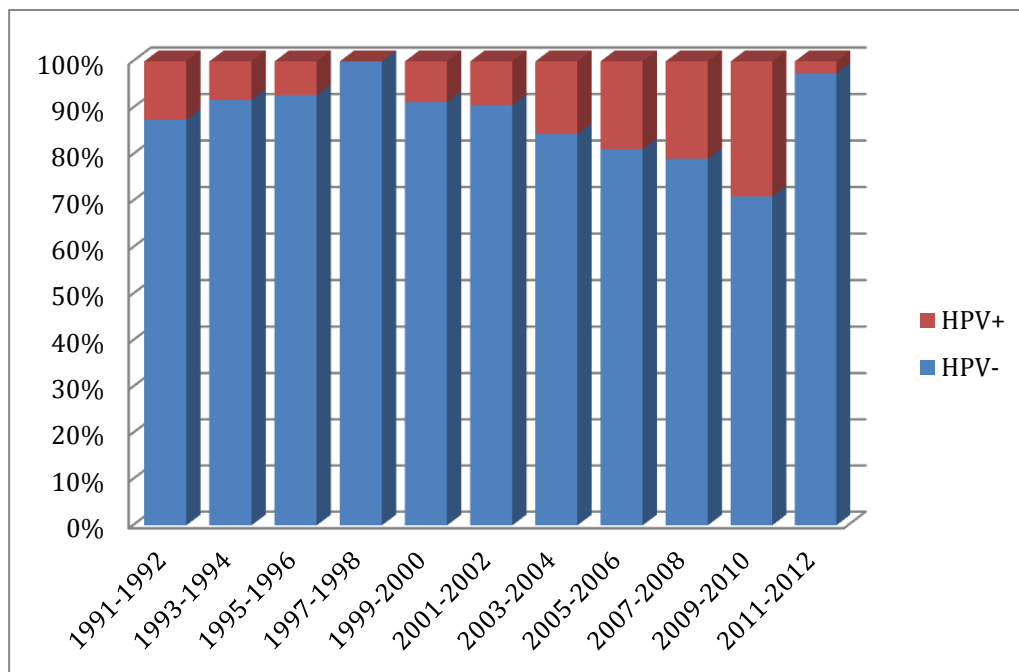


La siguiente tabla muestra la distribución en el número y porcentaje de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ en función de los periodos bi-anales.

		HPV	
		Negativo	Positivo
Año	1991-1992	30 (88.2%)	4 (11.8%)
	1993-1994	46 (92.0%)	4 (8.0%)
	1995-1996	38 (92.7%)	3 (7.3%)
	1997-1998	30 (100%)	0 (0%)
	1999-2000	21 (91.3%)	2 (8.7%)
	2001-2002	29 (90.6%)	3 (9.4%)
	2003-2004	27 (84.4%)	5 (15.6%)
	2005-2006	30 (81.1%)	7 (18.9%)
	2007-2008	34 (79.1%)	9 (20.9%)
	2009-2010	22 (71.0%)	9 (29.0%)
	2011-2012	37 (97.4%)	1 (2.6%)
Total		344 (88.0%)	47 (12.0%)

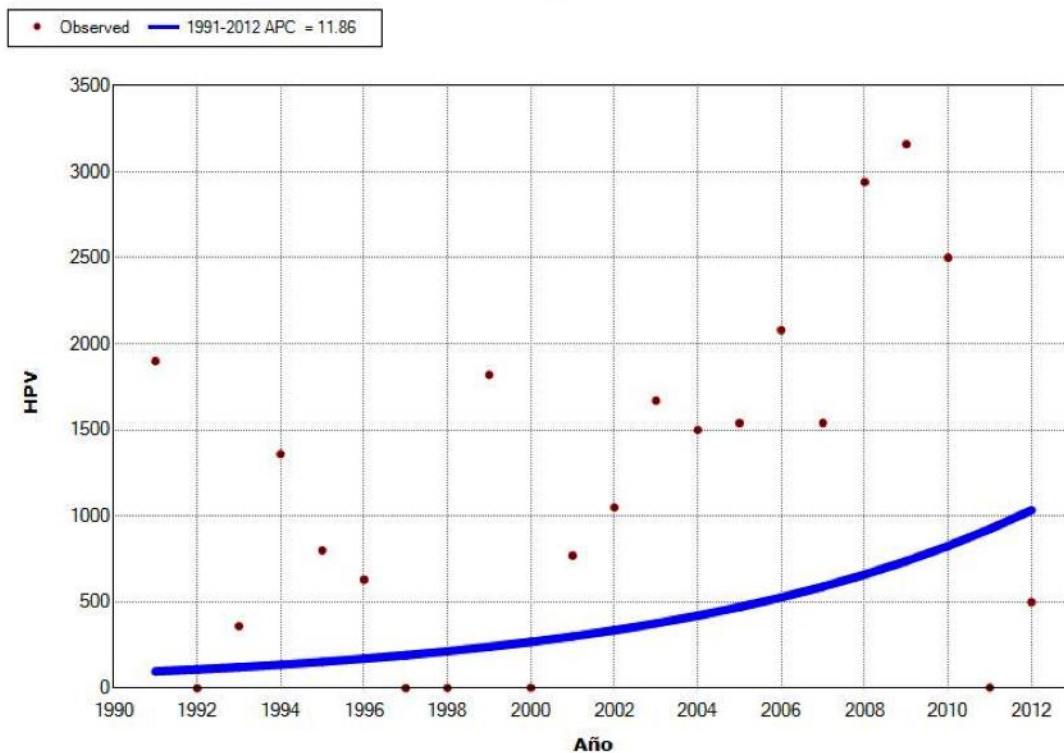
La siguiente figura representa gráficamente la proporción de pacientes HPV+ en función del año de diagnóstico de la enfermedad.

Resultados



A partir del año 2000 se apreció una tendencia al incremento en el porcentaje anual de pacientes HPV+, que sólo se vió interrumpida en el periodo de los últimos 2 años de estudio en los que el porcentaje se redujo de forma sustancial.

La siguiente figura muestra una representación de la tendencia existente en relación con el porcentaje de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ diagnosticados a los largo del periodo de estudio.



Existió una tendencia hacia el incremento gradual en el porcentaje de pacientes con tumores HPV+ a lo largo del periodo de estudio, si bien la tendencia no alcanzó la significación estadística. El valor del porcentaje de cambio anual (APC, representa la variación porcentual en la tasa de frecuencias correspondiente a un año respecto a la del año anterior) fue de 11.86% (IC 95%: -7.44 a 35.20%).

Resultados

Se analizó a continuación el porcentaje de pacientes HPV+ en función de la sub-localización del tumor en la orofaringe. La siguiente tabla muestra la distribución de los pacientes incluidos en el estudio en función de la sub-localización en relación con el estatus HPV.

		HPV		
		Negativo	Positivo	
Localización	Amígdala (n=150)	125	25	
		83,3%	16,7%	
	Paladar y úvula (n=88)	81	7	
		92,0%	8,0%	
	Base de lengua (n=125)	111	14	
		88,8%	11,2%	
	Pared posterior de orofaringe (n=28)	27	1	
		96,4%	3,6%	
	Total		344	47
			88,0%	12,0%

Existieron diferencias significativas en el porcentaje de pacientes HPV en función de la sub-localización del tumor ($p=0.023$). Tal y como cabía esperar, los pacientes con tumores localizados en la amígdala y la base de la lengua fueron los que contaron con un mayor porcentaje de tumores HPV+.

Se evaluó la relación entre la extensión local y regional de la enfermedad y la infección por HPV. La siguiente tabla muestra la distribución de la categoría de extensión local T en función del estatus HPV.

		HPV		Total
		Negativo	Positivo	
T	1	49 (14.2%)	5 (10.6%)	54 (13.8%)
	2	114 (33.1%)	21 (44.7%)	135 (34.5%)
	3	108 (31.4%)	17 (36.2%)	125 (32.0%)
	4	73 (21.2%)	4 (8.5%)	77 (19.7%)
Total		344 (100%)	47 (100%)	391 (100%)

No existieron diferencias significativas en la extensión local de la enfermedad en función de la situación HPV del tumor ($p=0.129$).

Resultados

Por el contrario, sí que aparecieron diferencias en la afectación regional en función del HPV. El porcentaje de tumores N0 en pacientes HPV- fue del 50.9%, en tanto que para los pacientes HPV+ fue del 23.4% ($p < 0.0001$). La siguiente tabla muestra la distribución de la categoría de afectación regional en función del HPV.

		HPV		Total
		Negativo	Positivo	
N	0	175 (50.9%)	11 (23.4%)	186 (47.6%)
	1	52 (15.1%)	12 (25.5%)	64 (16.4%)
	2	99 (28.8%)	22 (46.8%)	121 (30.9%)
	3	18 (5.2%)	2 (4.3%)	20 (5.1%)
Total		344 (100%)	47 (100%)	391 (100%)

Como consecuencia, los pacientes HPV+ contaron con una tendencia que no alcanzó la significación estadística ($p = 0.120$) a contar con tumores en estadios más avanzados, tal como muestra la siguiente tabla.

		HPV		Total
		Negativo	Positivo	
Estadio	I	39 (11.3%)	1 (2.1%)	40 (10.1%)
	II	64 (18.6%)	6 (12.8%)	70 (17.9%)
	III	88 (25.6%)	15 (31.9%)	103 (26.3%)
	IV	153 (44.5%)	25 (53.2%)	178 (45.5%)
Total		344 (100%)	47 (100%)	391 (100%)

En el momento del diagnóstico inicial, 5 pacientes contaron con la presencia de metástasis a distancia (M1): La totalidad de casos M1 correspondió a pacientes HPV-.

Se llevó a cabo una reclasificación de la morfología histológica de los tumores. La siguiente tabla muestra la distribución de las características morfológicas de los tumores.

	n	%
Convencional	368	94,1%
Basaloide	15	3,8%
Verrucoso	1	0,3%
Papilar	3	0,8%
Sarcomatoide	4	1,0%
Total	391	100,0

La gran mayoría de pacientes presentaron carcinomas escamosos de morfología convencional.

Resultados

Al considerar la relación entre la morfología del tumor y el estatus HPV, pudo comprobarse como las variantes basaloide, verrucosa y papilar aparecieron representadas en los pacientes HPV+, en tanto que los carcinomas sarcomatoides lo hicieron de forma exclusiva en los HPV- ($p=0.001$).

	HPV	
	Negativo	Positivo
Convencional	329 (89.4%)	39 (10.6%)
Basaloide	10 (66.7%)	5 (33.3%)
Verrucoso	0 (0%)	1 (100%)
Papilar	1 (33.3%)	2 (66.7%)
Sarcomatoide	4 (100%)	0 (0%)
Total	344 (88%)	47 (12%)

A partir de la valoración cualitativa de la calidad del marcador, del porcentaje de células teñidas, la intensidad de la tinción y la valoración del patrón de distribución del marcador, el equipo de patólogos que llevó a cabo el análisis inmunohistoquímico dictaminó la positividad del tumor para la p16. La siguiente tabla muestra la distribución de la positividad frente a p16 para el grupo de 47 pacientes HPV+.

HPV+	n	%
p16+	31	66,0%
p16-	16	34,0%
Total	47	100%

Llama la atención que en un tercio de los pacientes HPV+ la p16 resultó negativa, lo que implicaría que el mecanismo carcinogénico promotor de la aparición del tumor en este grupo de pacientes no se relacionaría con la acción carcinogénica del HPV.

Se evaluó igualmente la expresión de la p16 para un grupo “control” de pacientes con tumores HPV-. La siguiente tabla muestra los resultados en cuanto a positividad frente a la p16 para este grupo de pacientes.

HPV-	n	%
p16+	4	8.5%
p16-	43	91.5%
Total	47	100%

En el caso de los pacientes HPV-, menos del 10% de los pacientes fueron catalogados como p16+.

En 44 de los pacientes HPV+ se llevó a cabo una determinación de la expresión de la E6*ImRNA. La siguiente tabla de contingencia muestra el nivel de correspondencia existente entre la expresión del gen responsable de la codificación de la E6 a nivel del tumor y la actividad de la p16.

		E6mRNA		Total
		Negativo	Positivo	
	p16+	1 (3.3%)	29 (96.7%)	30 (100%)
	p16-	7 (50.0%)	7 (50.0%)	14 (100%)
Total		8	36	44

Para los pacientes p16+, un 96.7% mostró una expresión de la E6mRNA. De los 14 casos HPV-, la mitad mostraron expresión de E6mRNA.

Al analizar los pacientes HPV+/p16-, pudo apreciarse como aquellos pacientes con E6mRNA+ contaron con una tendencia a mostrar un mayor porcentaje de células p16+ ($p=0.005$), una mayor intensidad en la tinción ($p=0.462$), y un patrón de tinción difuso ($p=0.005$) que las E6mRNA-, tal como aparece en la siguiente tabla.

		E6mRNA -	E6mRNA +
tinción	<5%	7	1
	5-25%	0	6
Intensidad	0	2	0
	3	5	6
	4	0	1
Patrón	No tinción	7	1
	Difuso	0	6

Dado que la positividad frente a al p16 es una evaluación subjetiva y depende de los puntos de corte en que se hayan considerado para la valoración de dicha positividad, es posible que en los 7 pacientes HPV+/p16-/ E6mRNA+ el proceso carcinogénico pueda atribuirse al HPV, y que la determinación de la expresión de E6mRNA cuente con una mayor sensibilidad en el momento de relacionar la aparición de los tumores con los cambios promovidos por el HPV que la determinación inmunohistoquímica de la p16.

En la evaluación del proceso carcinogénico, además de la expresión de la p16 se evaluó mediante inmunohistoquímica la expresión de la p53, la pRb y la CD1, comparando los 47 tumores HPV+ con muestras de 47 tumores HPV-. La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos de estas determinaciones.

		HPV-	HPV+	p
p53	Negativo	22 (46.8%)	41 (91.1%)	p<0.0001
	Positivo	25 (53.2%)	4 (8.9%)	
pRb	Negativo	8 (17.4%)	31 (68.9%)	p<0.0001
	Positivo	38 (82.6%)	14 (31.1%)	
CD1	Negativo	9 (19.1%)	22 (47.8%)	p=0.003
	Positivo	38 (80.9%)	24 (52.2%)	

En relación a los pacientes HPV-, los pacientes con tumores HPV contaron con una tendencia altamente significativa a presentar tumores con una menor expresión de las proteínas p53, pRb y CD1.

Relación entre HPV y las variables epidemiológicas

No aparecieron diferencias significativas en la edad de los pacientes en función del estatus HPV. La edad media de los pacientes HPV+ fue de 60.8 años (desviación estándar de 12.7 años) y la de los pacientes HPV- fue de 60.9 años (desviación estándar de 10.6 años) ($p=0.975$).

Por el contrario, sí que aparecieron diferencias significativas en el sexo de los pacientes en función del estatus HPV. La siguiente tabla de contingencia muestra la distribución de los pacientes en función del sexo y la infección por HPV.

		HPV		Total
		Negativo	Positivo	
Sexo	Hombre	319	35	354
	90,1%	9,9%	90,5%	
	Mujer	25	12	37
	67,6%	32,4%	9,5%	
Total		344	47	391
		88,0%	12,0%	100,0%
		100,0%	100,0%	100,0%

Un 32.4% de las mujeres con carcinoma de orofaringe mostraron infección por virus HPV, frente a sólo un 9.9% de la población masculina con cáncer de orofaringe ($p=0.0001$).

Igualmente, aparecieron diferencias significativas en los antecedentes de consumo de tóxicos (tabaco y alcohol) en función de la situación HPV de los pacientes. La siguiente tabla muestra la distribución en el consumo de tabaco para los pacientes incluidos en el estudio.

		HPV		Total
		Negativo	Positivo	
Tabaco	No consumo	14	18	32
		4,1%	38,3%	8,2%
	< 20 cigarrillos/día	42	9	51
		12,2%	19,1%	13,0%
	≥ 20 cigarrillos/día	288	20	308
		83,7%	42,6%	78,8%
Total		344	47	391
		100,0%	100,0%	100,0%

De los pacientes HPV+ un 38.3% no eran fumadores y un 19.1% lo eran de forma moderada, frente al 83.7% de fumadores importantes en el grupo de los pacientes HPV- ($p=0.0001$).

Resultados

Al analizar el consumo de alcohol, pudo comprobarse igualmente como los pacientes HPV+ contaron con unos antecedentes de consumo reducidos en relación a los pacientes HPV-, tal como aparece en la siguiente tabla.

		HPV		Total
		Negativo	Positivo	
Alcohol	No consumo	30	20	50
		8,7%	42,6%	12,8%
	<80 gr /día	92	19	111
		26,7%	40,4%	28,4%
	≥ 80 gr /día	222	8	230
		64,5%	17,0%	58,8%
Total		344	47	391
		100,0%	100,0%	100,0 %

Sólo un 17% de los pacientes HPV+ reconocieron unos consumos importantes de alcohol, frente al 64.5% correspondiente a los pacientes HPV- (p=0.0001).

Al agrupar a los pacientes en función del consumo conjunto de ambos tóxicos, considerando tres categorías: no consumo, consumo moderado (<20 cigarrillos/día y/o < 80 gr alcohol /día), y consumo importante (≥ 20 cigarrillos/día y/o ≥ 80 gr alcohol /día), pudo apreciarse como los pacientes HPV+ contaron con una carga de tóxicos significativamente inferior que la de los pacientes HPV-.

		HPV		Total
		Negativo	Positivo	
Tóxicos	No consumo	10	15	25
		2,9%	31,9%	6,4%
	Consumo moderado	30	12	42
		8,7%	25,5%	10,7 %
	Consumo importante	304	20	324
		88,4%	42,6%	82,9 %
Total		344	47	391
		100,0%	100,0%	100,0 %

Al considerar a los pacientes HPV+, un 31.9% no reconocían antecedentes en el consumo de tóxicos, y en 25.5% el consumo era moderado, frente a un 88.4% de pacientes con consumo importante de tóxicos en el grupo HPV- ($p=0.0001$)

Resultados

El estado general de los pacientes medido de acuerdo con el índice de Karnofsky no demostró que existieran diferencias significativas en función de la infección HPV, tal como aparece en la siguiente tabla ($p=1.0$)

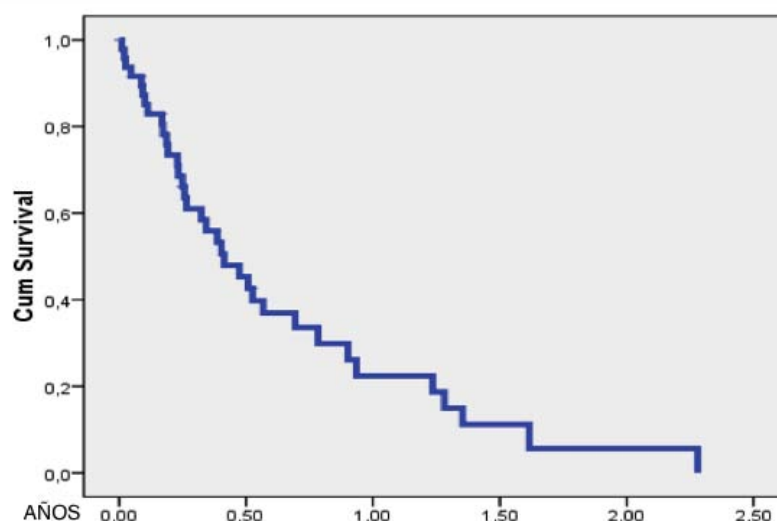
		HPV		Total
		Negativo	Positivo	
Karnofski	70%	20	2	22
		5,8%	4,3%	5,6%
	80%	54	7	61
		15,7%	14,9%	15,6%
	90%	270	38	308
		78,5%	80,9%	78,8%
Total		344	47	391
		100,0%	100,0%	100,0 %

Relación de HPV con los resultados del tratamiento

De los pacientes inicialmente incluidos en el estudio, uno de los pacientes no llevó a cabo el tratamiento en nuestro centro. El tratamiento realizado por los 390 pacientes restantes es el que se muestra en la siguiente tabla.

	n	%
Paliación	49	12,6%
RT / QT-RT	244	62,6%
Cirugía	57	14,6%
Cirugía + RT/QTRT	40	10,2%
Total	390	100,0%

El tratamiento paliativo consistió en la administración exclusiva de quimioterapia en 25 ocasiones, un tratamiento con radioterapia con finalidad paliativa en 7, y medidas de soporte en 17 pacientes. La siguiente figura muestra la curva de supervivencia correspondiente a los pacientes que no recibieron tratamiento con intención radical. La totalidad de estos pacientes fallecieron antes de transcurridos 2.5 años de haberse diagnosticado la enfermedad.

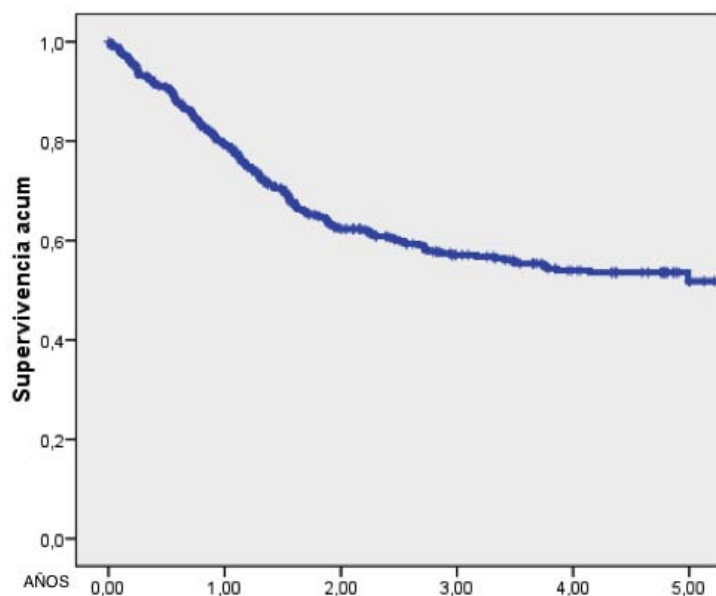


No existieron diferencias significativas en el porcentaje de pacientes que fueron considerados candidatos a un tratamiento paliativo en función del estatus HPV, si bien apareció una tendencia según la cual los pacientes HPV- contaron con

una mayor probabilidad de no seguir un tratamiento con intención radical. De los pacientes HPV+ el porcentaje de pacientes que no siguió un tratamiento con intención radical fue del 4.3%, en tanto que para los pacientes HPV- alcanzó el 13.7% ($p=0.067$).

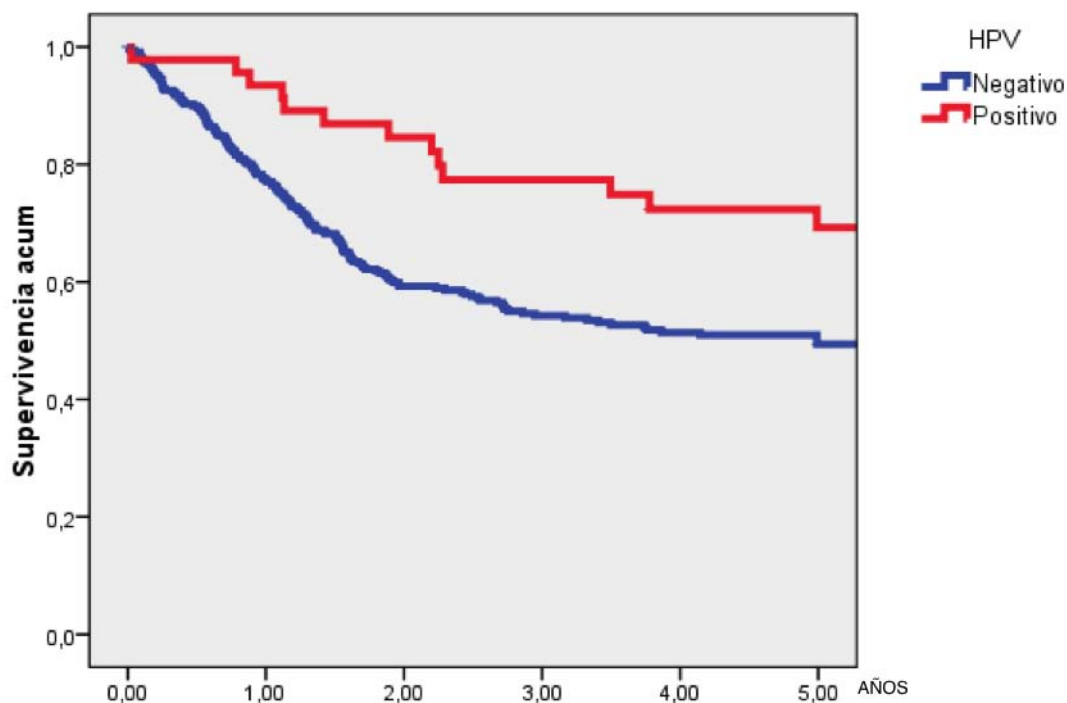
En el momento del cierre del estudio 2 pacientes con una recidiva loco-regional y un paciente con metástasis a distancia se encontraban vivos y con enfermedad, siguiendo tratamiento con quimioterapia con intención paliativa. A efectos de cálculo de supervivencia estos 3 pacientes fueron considerados como fallecidos a consecuencia de la evolución de la enfermedad con fecha del último control. Cuatro pacientes tratados con intención radical no contaron con un seguimiento mínimo de 2 años, y no fueron considerados en los cálculos relacionados con la supervivencia y el control de la enfermedad. Uno de estos pacientes fue positivo para un HPV-16. Ninguno de estos cuatro pacientes había sufrido una recidiva local, regional o a distancia previa a la fecha del último control.

La siguiente figura muestra la curva de supervivencia actuarial ajustada (considerando sólo las muertes ocasionadas por el carcinoma de orofaringe) para el conjunto de 386 pacientes tratados en nuestro centro y con un seguimiento mínimo de 2 años o hasta su fallecimiento.



La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes con carcinomas de orofaringe incluidos en el estudio fue de 51.8% (IC 95%: 46.3-57.0%).

Existieron diferencias significativas en la supervivencia ajustada de la enfermedad en función de estatus HPV ($p=0.008$), tal como muestra la siguiente figura.

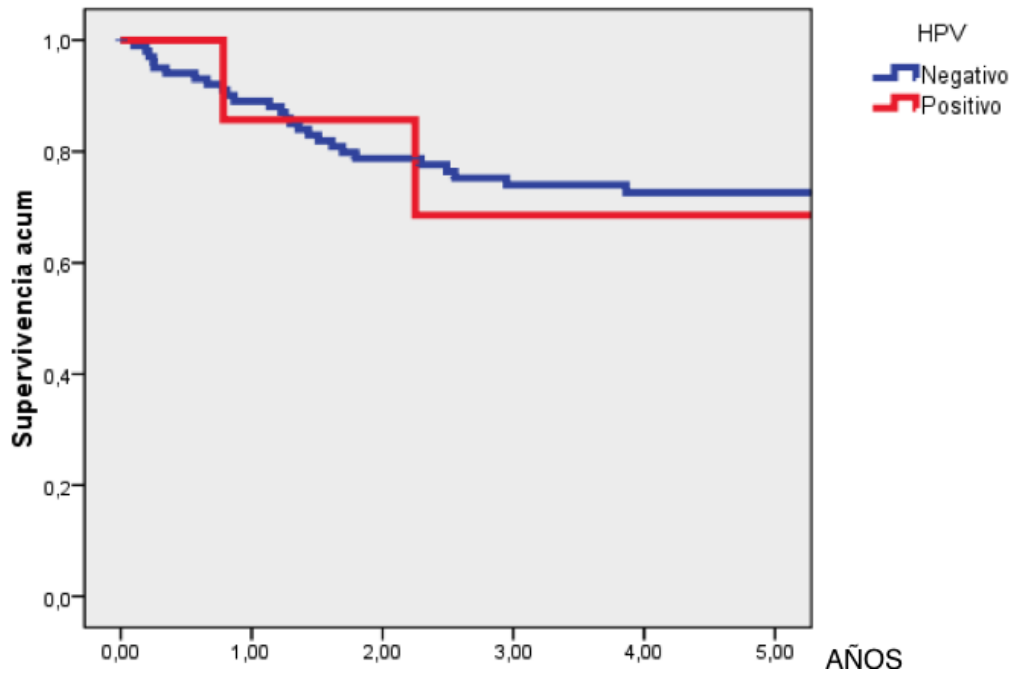


La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes HPV+ fue del 69.2% (IC 95%: 57.7-80.7%), y para los pacientes HPV- del 49.4% (IC 95%: 43.8-55.0%).

Al considerar la supervivencia en función del estadiaje del tumor, pudo comprobarse como las diferencias en cuanto a supervivencia en función del estatus HPV aparecieron básicamente a expensas de los pacientes con tumores con estadios avanzados. Para los pacientes con tumores con estadios iniciales (estadios I-II), no aparecieron diferencias significativas en la supervivencia en relación a existencia de una infección por HPV ($p=0.886$). De hecho, los pacientes HPV+ ($n=7$) contaron con una supervivencia ajustada inferior a la correspondiente a los pacientes HPV- ($n=102$), tal como aparece en la siguiente figura.

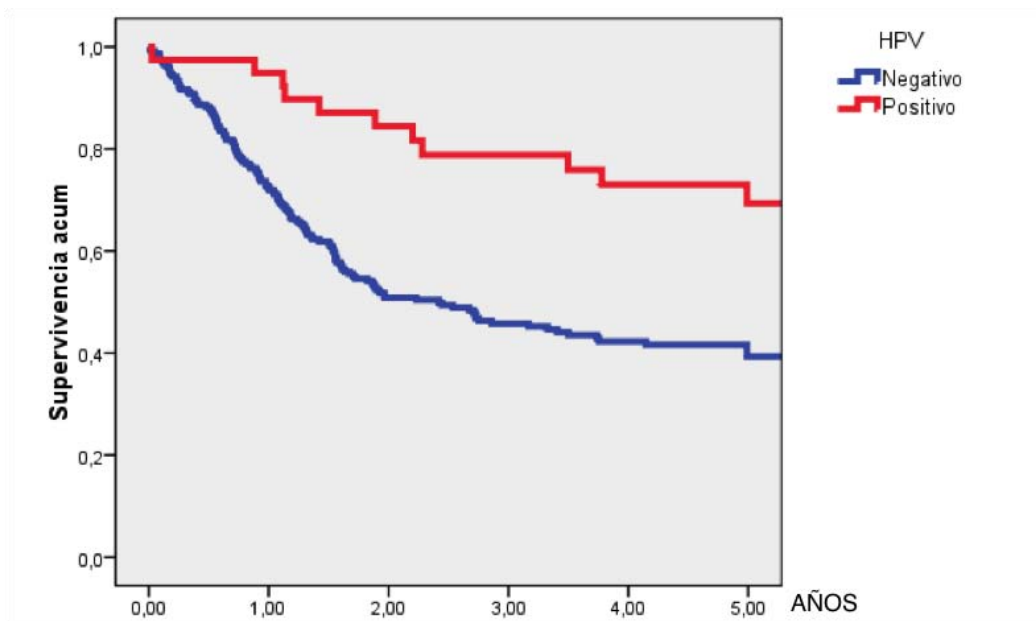
Estadios iniciales:

Resultados



Por el contrario, al analizar los pacientes con tumores con estadios avanzados (estadios III-IV), la supervivencia para los pacientes HPV+ fue significativamente superior a la correspondiente a los HPV- ($p=0.001$).

Estadios avanzados:

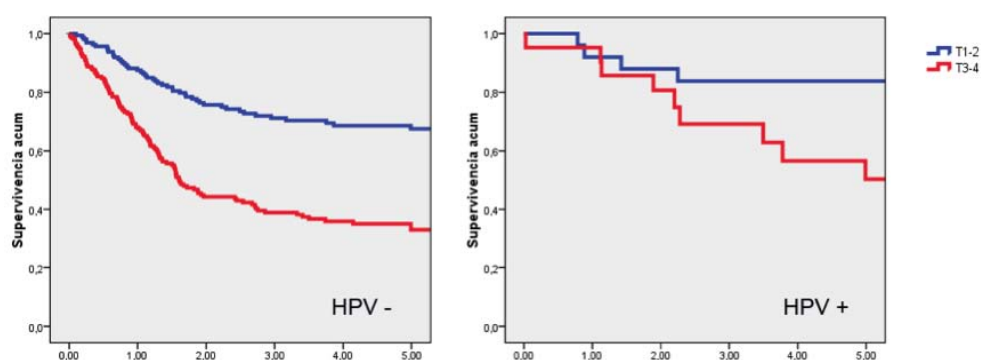


La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes con tumores con estadio III-IV HPV+ ($n=39$) fue del 69.3% (IC 95%: 53.1-84.5%), en tanto que

para los pacientes con tumores HPV- (n=238) descendió al 39.3% (IC 95%: 32.5-46.1%).

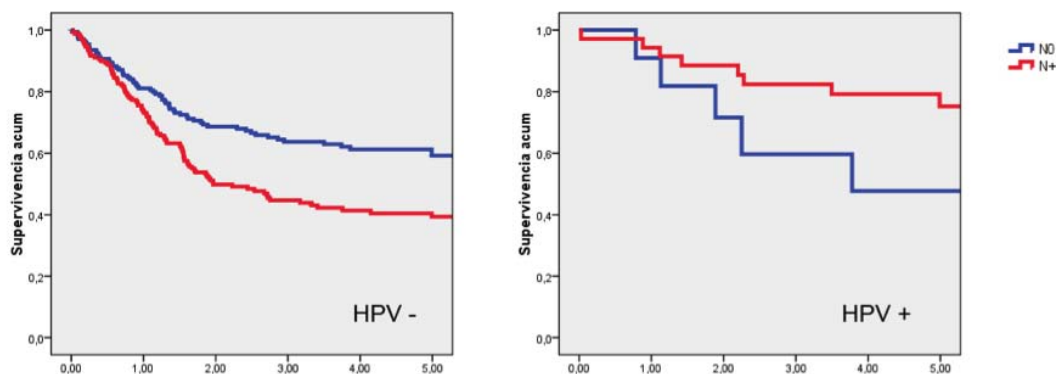
Se analizó a continuación la capacidad pronóstica de la extensión local (T) y regional (N) de los tumores en función del estatus HPV. La categoría de la extensión local del tumor (T1-2 versus T3-4) contó con capacidad pronóstica tanto para los pacientes HPV+ (p=0.042), como para los HPV- (p<0.0001), tal como muestran las siguientes curvas de supervivencia.

T:



La categoría de extensión regional (N0 versus N+) no contó con capacidad pronóstica en el caso de los pacientes HPV+ (p=0.09). Paradójicamente, en el grupo HPV+ los pacientes N0 contaron con una peor supervivencia que los pacientes N+. Para los pacientes HPV- la afectación regional mantuvo su capacidad pronóstica (p=0.001), tal como se aprecia en las siguientes figuras.

N:



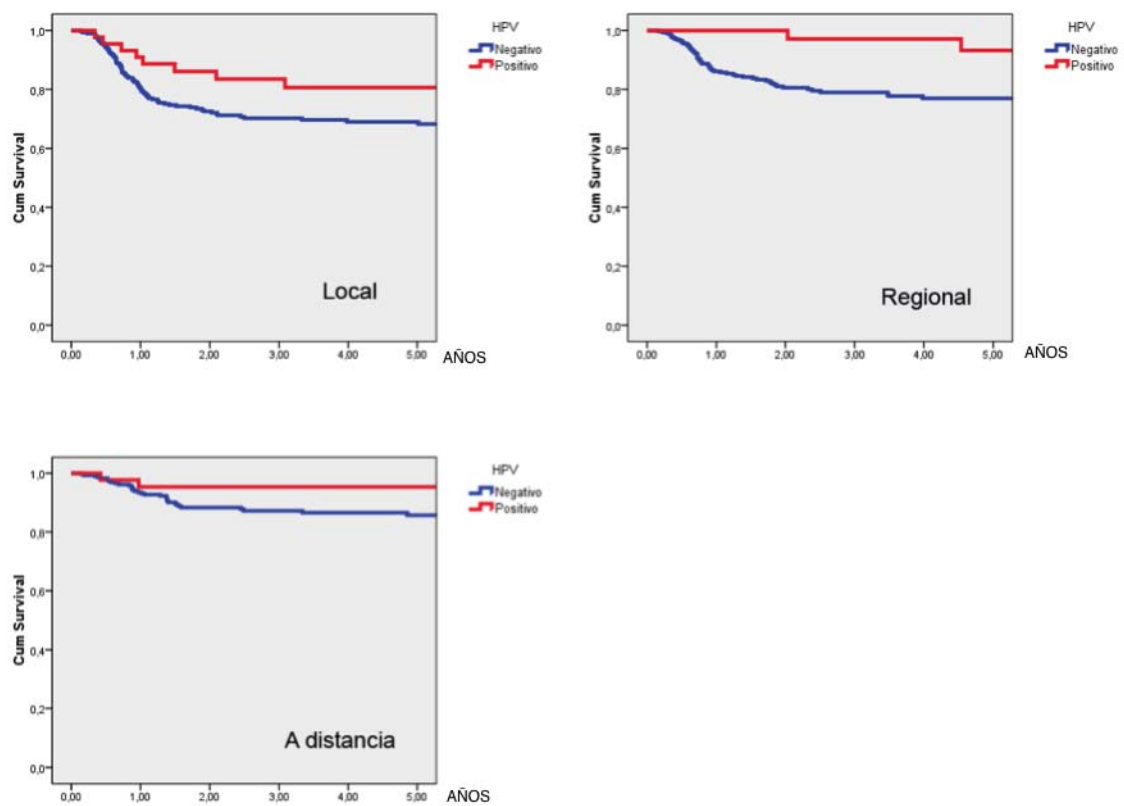
Del total de 337 pacientes tratados con intención radical y con un seguimiento adecuado, durante el periodo de seguimiento un total de 62 pacientes (18.4%)

Resultados

sufrieron una recidiva local del tumor, 31 pacientes (9.2%) una recidiva regional aislada, y 30 pacientes (8.9%) una recidiva conjunta local y regional. Además 36 pacientes (10.7%) contaron con la aparición de metástasis a distancia.

Se analizó el control local, regional y a distancia en función del estatus HPV, considerando sólo a los pacientes tratados con intención radical (n=337). Las siguientes figuras muestran las curvas de supervivencia libres de recidiva local, regional o a distancia de la enfermedad.

Recidivas:



Los pacientes HPV+ contaron con una mejor supervivencia local, regional y a distancia, alcanzando estas diferencias la significación estadística en el caso del control de la enfermedad a nivel cervical. La siguiente tabla muestra la supervivencia actuarial a los 5 años libre de enfermedad local, regional y a distancia para los pacientes incluidos en el estudio.

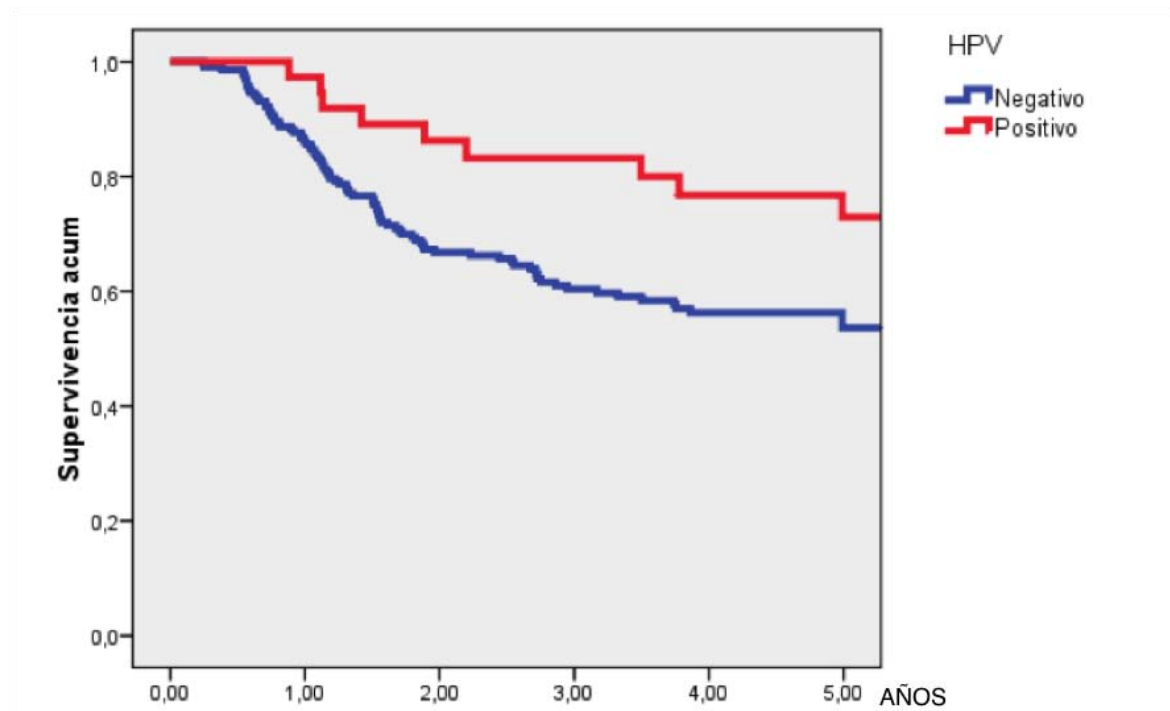
Recidiva		Supervivencia 5 años	IC 95%	p
Local	HPV-	68.2%	62.4-74.0%	0.095
	HPV+	80.6%	68.2-93.0%	
Regional	HPV-	77.0%	71.8-82.2%	0.009
	HPV+	93.3%	84.1-100%	
A distancia	HPV-	85.8%	81.1-90.5%	0.123
	HPV+	95.3%	89.1-100%	

A continuación, se llevó a cabo un análisis de los resultados obtenidos en función del tipo de tratamiento realizado, considerando por una parte los pacientes tratados con radioterapia o quimioradioterapia (n=243), y por el otro a los pacientes tratados con cirugía, con o sin tratamiento adyuvante con radioterapia o quimioradioterapia (n=94).

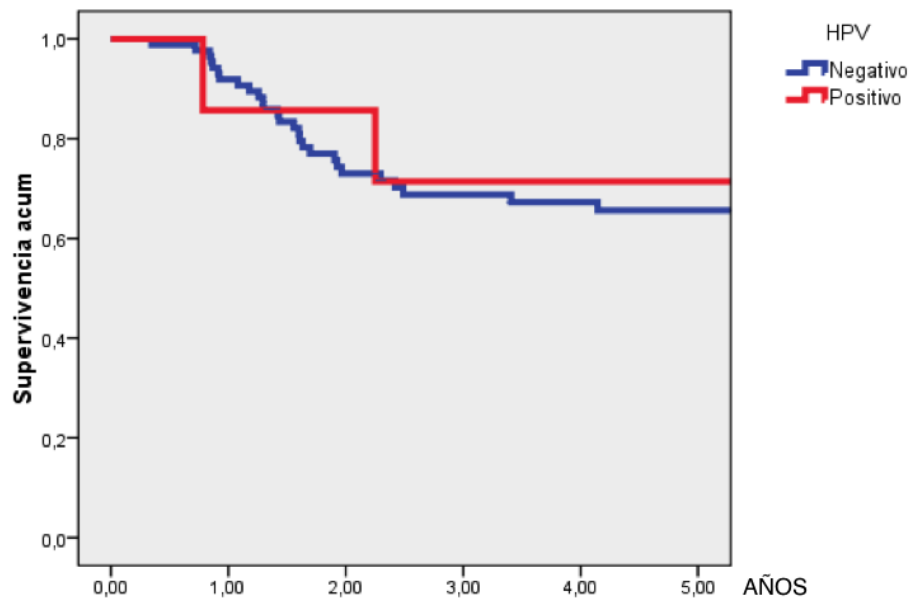
Resultados

Pudo apreciarse como la supervivencia para los pacientes HPV+ tratados con radioterapia/quimiorradioterapia (n=37) fue significativamente superior a la correspondiente a los pacientes HPV- (n=206) (p=0.025).

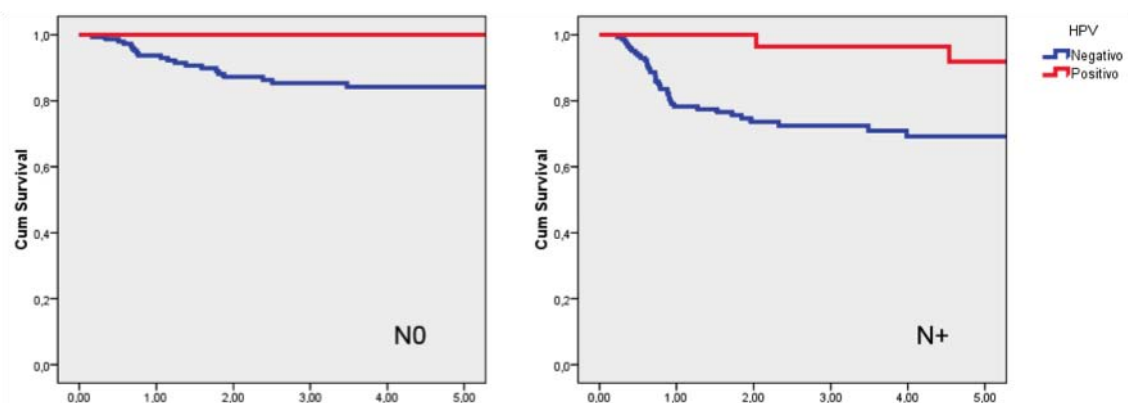
Tratamiento con radioterapia/quimiorradioterapia:



Por el contrario, no aparecieron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia de la enfermedad para el grupo de pacientes tratados con cirugía, complementada o no con radioterapia postoperatoria, tal como se aprecia en la siguiente figura (HPV+, n= 7; HPV-,n=87) (p=0.796).

Tratamiento con cirugía +/- radioterapia postoperatoria:

Destaca el elevado control de la enfermedad a nivel regional para los pacientes HPV+. A pesar de que los pacientes HPV+ contaron con una mayor frecuencia de afectación a nivel cervical, el control de la enfermedad a nivel ganglionar fue superior al conseguido en el grupo de pacientes HPV-. Las siguientes figuras muestran las curvas de supervivencia libre de enfermedad ganglionar para los pacientes tratados con intención radical, considerando los pacientes N0 y N+ en función del estatus HPV.

Afectación ganglionar:

Tanto para los N0 como para los N+, los pacientes HPV+ contaron con un mejor control de la enfermedad (pacientes N0, $p=0.210$; pacientes N+, $p=0.006$).

Resultados

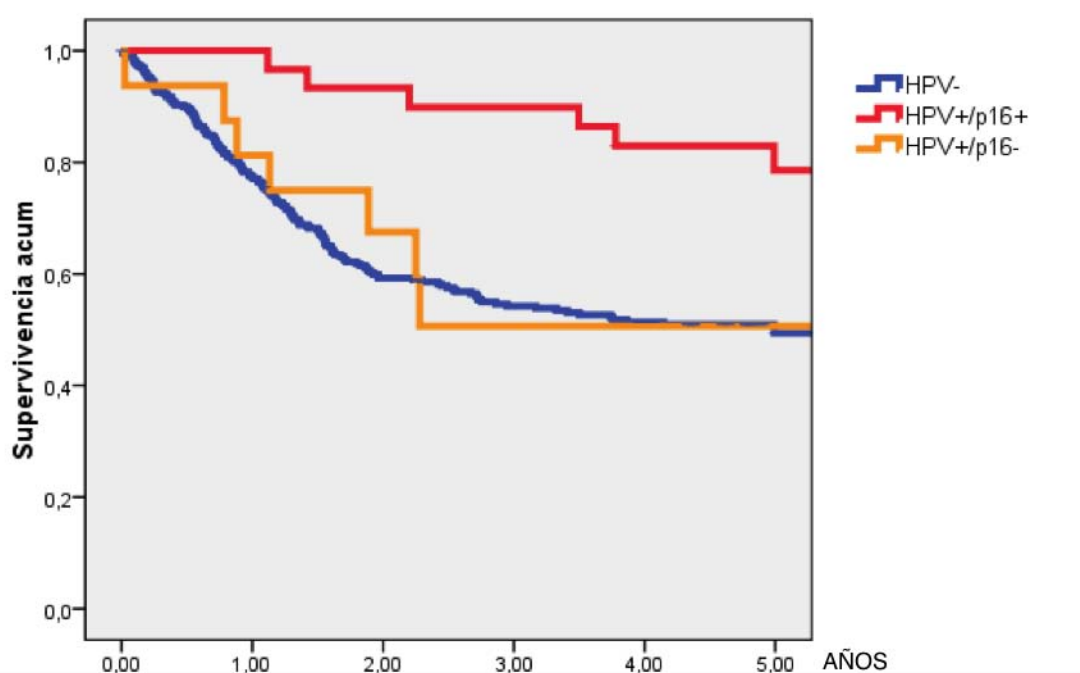
Una valoración objetiva de la efectividad de los tratamientos a nivel cervical es la valoración patológica de los vaciamentos realizados con posterioridad a un tratamiento con radioterapia o quimioradioterapia. Un total de 41 pacientes, todos ellos inicialmente N+, tratados con radioterapia o quimioradioterapia sobre la localización primaria del tumor recibieron de forma adicional un vaciamiento cervical uni o bilateral una vez finalizado este tratamiento inicial. No existieron diferencias significativas en la distribución de las categorías de extensión regional de la enfermedad en función del estatus HPV ($p=1.0$).

		HPV	
		Negativo	Positivo
Categoría N inicial	1	4	0
		11,8%	0,0%
	2	25	6
		73,5%	85, 7%
	3	5	1
		14,7%	14,3%
Total		34	7
		100,0%	100,0%

De los 7 pacientes HPV+ intervenidos, sólo en una ocasión (14.3%) el estudio anatomopatológico mostró evidencia de restos de tumor viable a nivel ganglionar, en tanto que aparecieron restos de la enfermedad a nivel cervical en 14 de los 34 pacientes HPV- sometidos a un vaciamiento cervical post-RT (41.2%). Si bien dado el número limitado de la muestra evaluada no aparecieron diferencias significativas en el porcentaje de pacientes pN+ tras el tratamiento con radioterapia ($p=0.232$), se pudo observar una tendencia de acuerdo con la

cual los pacientes con tumores HPV- contaron con una mayor resistencia al tratamiento con radioterapia o quimiorradioterapia a nivel cervical, lo que podría ser uno de los motivos que justificase el peor control de la enfermedad a nivel ganglionar para este grupo de pacientes.

Finalmente, se analizó la supervivencia considerando tanto el estatus HPV como la inmunopositividad frente a la p16 considerando tres grupos de pacientes: HPV+/p16+ (n=30), HPV+/p16- (n=16) y HPV- (n=340).

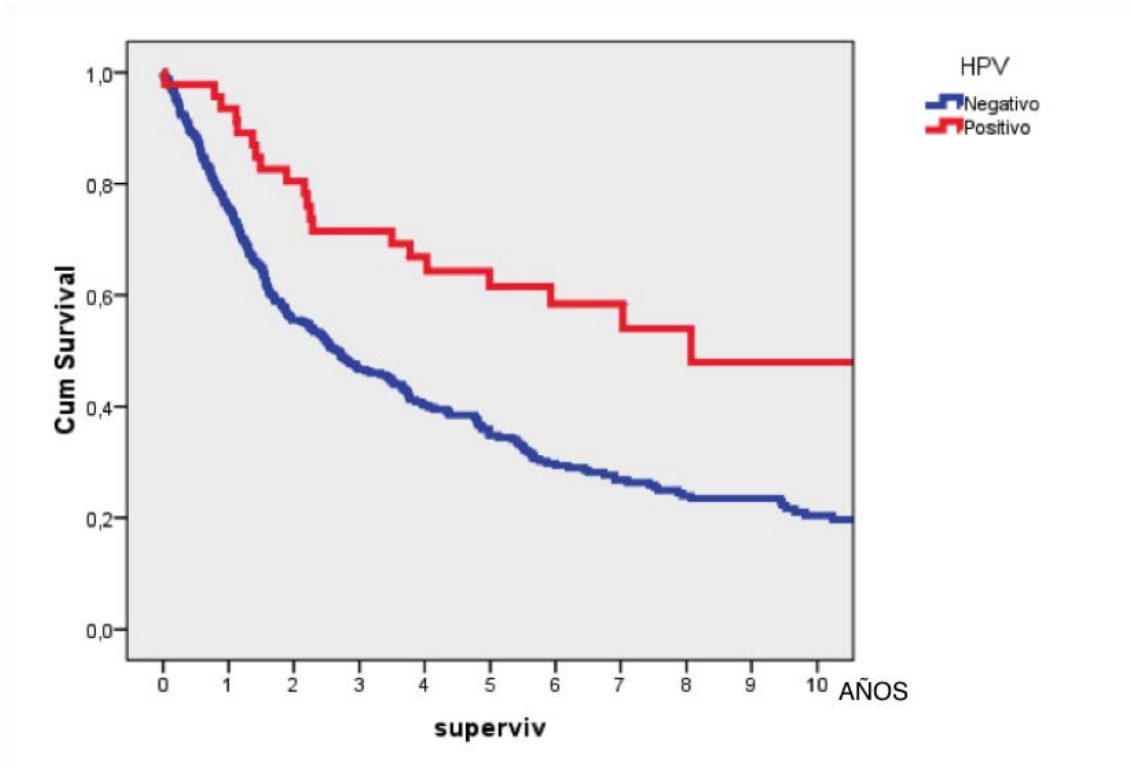


Existieron diferencias significativas en la supervivencia en función del estatus HPV/p16 ($p=0.009$). Los pacientes HPV+/p16+ fueron los que contaron con una mejor supervivencia (supervivencia ajustada a los 5 años de 78.6%, IC 95%: 63.4-93.8%), en tanto que los pacientes HPV- y los pacientes HPV+/p16- contaron con unas cifras de supervivencia ajustada a los 5 años inferiores, de 49.4% (IC 95%: 43.8-55.0%), y 50.6% (IC 95%: 23.8-77.4%), respectivamente.

Al analizar se forma exclusiva a los pacientes HPV+, existieron diferencias significativas en la supervivencia ajustada en función del grado de expresión de la p16 (HPV+/p16+ versus HPV+/p16-) ($p=0.018$).

Resultados

La siguiente figura muestra la curva de supervivencia actuarial observada (considerando todas las causas de muerte) en función del estatus HPV, prolongando el seguimiento hasta los 10 años de diagnosticado el tumor orofaríngeo.



La supervivencia observada a los 5 y 10 años para los pacientes HPV- fue del 34.8% (IC 95%: 29.6-40.0%) y del 20.4% (IC 95%: 15.4-25.4%), y para los pacientes HPV+ del 61.5% (IC 95%: 47.0-76.0%) y 48.0% (IC 95%: 29.8-66.2%), respectivamente. Existieron diferencias significativas en la supervivencia observada en función del estatus HPV ($p < 0.0001$)

Resultados del análisis multivariante

Se llevó a cabo un análisis multivariante con el modelo de riesgos proporcionales de Cox considerando como variable dependiente la supervivencia ajustada, y como variables independientes el sexo de los pacientes, la categoría de extensión local (T1-2 versus T3-4) y regional (N0 versus N+) del tumor, la sublocalización en la orofaringe, y el estatus HPV/p16 (HPV+/p16+ versus HPV+/p16- versus HPV-).

		OR (IC 95%)	p
T	T1-2	1	
	T3-4	2,5 (1.8-3.5)	0,000
N	N0	1	
	N+	1,3 (0.9-1.7)	0,162
Localización	Amígdala	1	
	Paladar-úvula	0,9 (0.5-1.4)	0,604
	Base de lengua	1,1 (0.7-1.5)	0,731
	Pared posterior	2,0 (1.2-3.4)	0,010
Estatus HPV	HPV+/p16+	1	
	HPV+/p16-	2,5 (0.8-7.5)	0,102
	HPV-	3,2 (1.4-7.3)	0,006

De acuerdo con los resultados del modelo multivariante, el estatus HPV/p16 apareció como una variable que se relacionó de forma significativa con la supervivencia ajustada. Tomando como categoría de referencia a los pacientes HPV+/p16+, los pacientes HPV+/p16- contaron con un riesgo 2.5 veces superior de fallecer como consecuencia del tumor de orofaringe (IC 95%: 0.8-7.5, p=0.102), y los pacientes HPV- un riesgo 3.2 veces superior (IC 95%: 1.4-7.3, p=0.006). Las otras variables que se relacionaron de forma significativa con la supervivencia de la enfermedad fueron la extensión local del tumor, y la localización del tumor a nivel de la pared posterior de la orofaringe.

Riesgo de segundas neoplasias en función del estatus HPV

De los 392 pacientes incluidos en el estudio, 176 (44.9%) contaron con el antecedente de presentar además del carcinoma de orofaringe otro tumor maligno diagnosticado de forma previa o con posterioridad al carcinoma de orofaringe. Además del carcinoma de orofaringe, 117 pacientes (29.8%) presentaron otro tumor adicional, 35 (8.9%) dos tumores, 19 (4.8%) tres, y 5 pacientes (1.3%) cuatro o más tumores.

De forma previa al diagnóstico del carcinoma de orofaringe, un total de 100 pacientes (25.5%) contaron con el antecedente de un tumor previo. Durante el periodo de seguimiento con posterioridad al carcinoma de orofaringe, 107 pacientes (27.3%) presentaron una neoplasia sucesiva. El porcentaje de pacientes que contaron con el antecedente de una neoplasia previa o que desarrollaron una neoplasia sucesiva fue significativamente superior para el grupo de pacientes HPV-, tal como aparece en la siguiente tabla.

		HPV-	HPV+	p
Neo previa	No	249 (72.4%)	42 (89.4%)	p=0.012
	Sí	95 (27.6%)	5 (10.6%)	
Neo sucesiva	No	244 (70.9%)	40 (85.1%)	p=0.041
	Sí	100 (29.1%)	7 (14.9%)	

Estatus HPV en tumores localizados fuera de la orofaringe

Tal como establecimos en el apartado de material y métodos, se llevó a cabo una determinación de la infección por HPV de una muestra aleatoria de unos 100 pacientes con carcinomas escamosos localizados en la cavidad oral (59 casos) o la laringe-hipofaringe (48 casos) tratados en el Hospital de Sant Pau durante el mismo periodo de estudio en que se incluyeron los pacientes con los carcinomas de orofaringe.

La siguiente tabla muestra la distribución por sub-localizaciones de este grupo de tumores.

		n	%
Cavidad oral	Labio y encía	6	5.6%
	Suelo de boca	17	15.9%
	Lengua móvil	25	23.4%
	Paladar duro	3	2.8%
	Mucosa yugal	4	3.7%
	Trígono	4	3.7%
Laringe-hipofaringe	Hipofaringe	5	4.7%
	Supraglotis	16	15.0%
	Glottis	27	25.2%
Total		107	100%

De acuerdo con los resultados, ninguno de los tumores analizados mostró positividad frente al HPV.

Resultados

Discusión

Epidemiología de los carcinomas de orofaringe HPV

Revisión de la literatura.

Existe una marcada variabilidad en el porcentaje de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ en función de la zona geográfica de procedencia de los pacientes. Marur y cols¹¹⁷ llevaron a cabo en 2010 una revisión de los porcentajes de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ comunicados en diferentes series. De acuerdo con sus resultados, los estudios realizados con pacientes norteamericanos mostraron una mayor homogeneidad en la proporción de pacientes con tumores HPV+, en tanto que la variabilidad en la positividad de los estudios realizados con pacientes europeos fue muy superior, oscilando entre el 10% y casi el 90% dependiendo de la serie analizada.

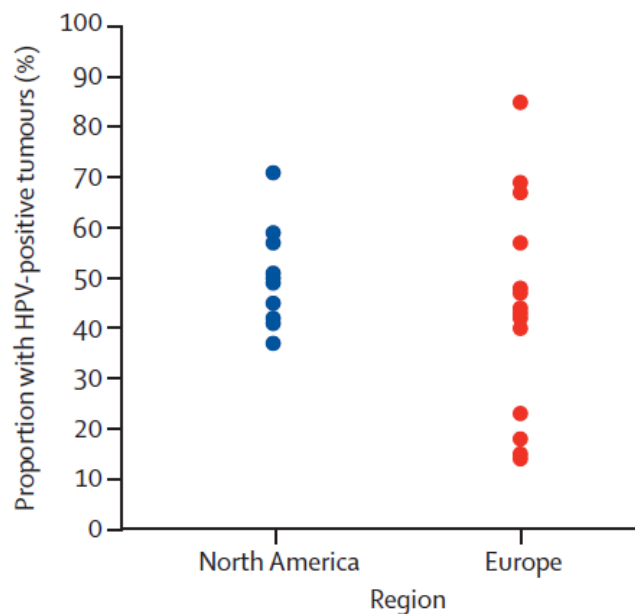


FIGURA 29: Gráfica que muestra la positividad de HPV en Norte América (azul), y en Europa (rojo) (tomada de Marur¹¹⁷).

Esta variabilidad dentro de los países europeos se debe a que en los países del norte se observa una marcada prevalencia a diferencia de los países meridionales donde la prevalencia no es tan marcada. A continuación se exponen diferentes estudios publicados en los países del norte.

Näsman y cols⁵⁸ realizaron un estudio en Estocolmo (Suecia) en que evaluaron los porcentajes en la positividad frente al HPV en carcinomas de amígdala a lo

Discusión

largo del periodo 1970-2007. Se estudió la presencia de ADN-HPV y HPV-16 E6 y E7 ARN mediante PCR y RT-PCR. Los autores encontraron un incremento progresivo en la frecuencia de tumores HPV+ a lo largo del periodo de estudio, tal como aparece en el siguiente figura, alcanzando un porcentaje de tumores HPV+ cercano al 80% en la fase final del periodo analizado.

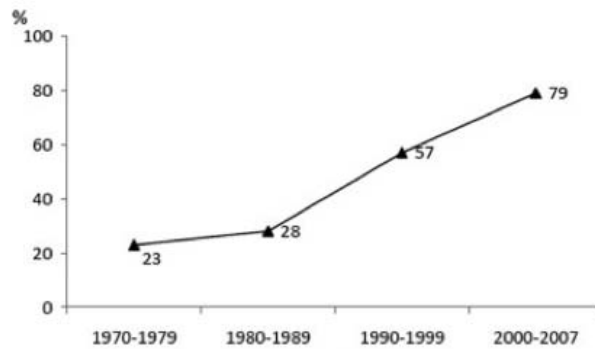


FIGURA 30: Gráfica que representa el porcentaje creciente de carcinomas de orofaringe HPV+ en Estocolmo (tomada de Näsman⁵⁸).

Por su parte, en un estudio realizado en Dinamarca sobre la incidencia de tumores de cabeza y cuello durante el periodo 1978-2007, Blomberg y cols¹¹⁸ observaron un incremento significativo en la tasa de incidencia de carcinomas aparecidos en áreas relacionadas con el HPV, especialmente en el caso de los pacientes del sexo masculino.

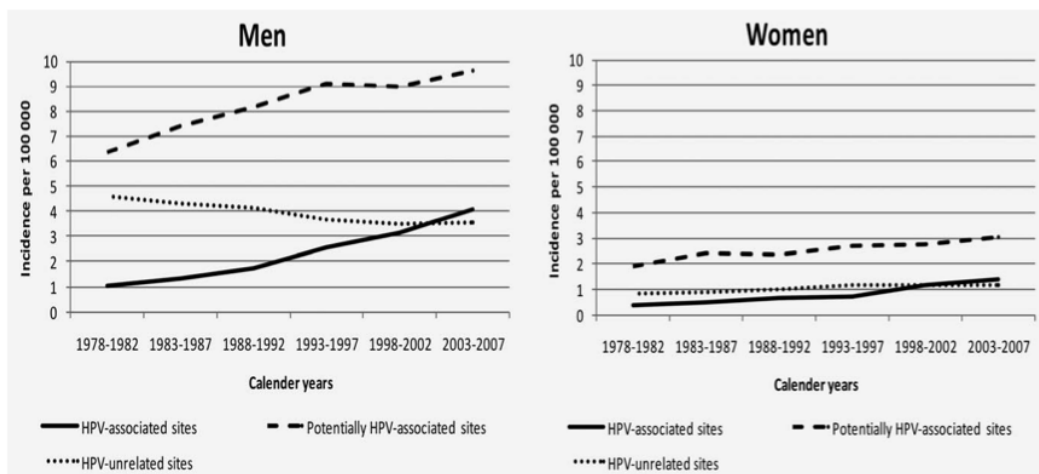


FIGURA 31: Gráfica donde se representa la incidencia estandarizada por 100.000 habitantes/año de carcinomas de cabeza y cuello en ambos sexos y en las diferentes localizaciones (tomada de Blomberg¹¹⁸)

Posteriormente en este país, a partir de los datos de un registro poblacional de la zona este, Garnaes y cols¹¹⁹ describieron un aumento en la incidencia de aparición de carcinomas de amígdala a expensas de los tumores HPV+. Los autores analizaron el periodo 2000-2010, durante el cual se diagnosticaron un total de 816 nuevos carcinomas de amígdala. La prevalencia global de tumores HPV+ fue del 58%, siendo el genotipo predominante el HPV-16. Pudieron evidenciar un incremento en la incidencia global de carcinomas de amígdala de un 2.7% anual, que apareció a expensas del incremento en la incidencia de tumores HPV+, con un aumento en la incidencia anual del 4.9%, en tanto que los tumores HPV- disminuyeron ligeramente su incidencia de aparición (-0.23% anual).

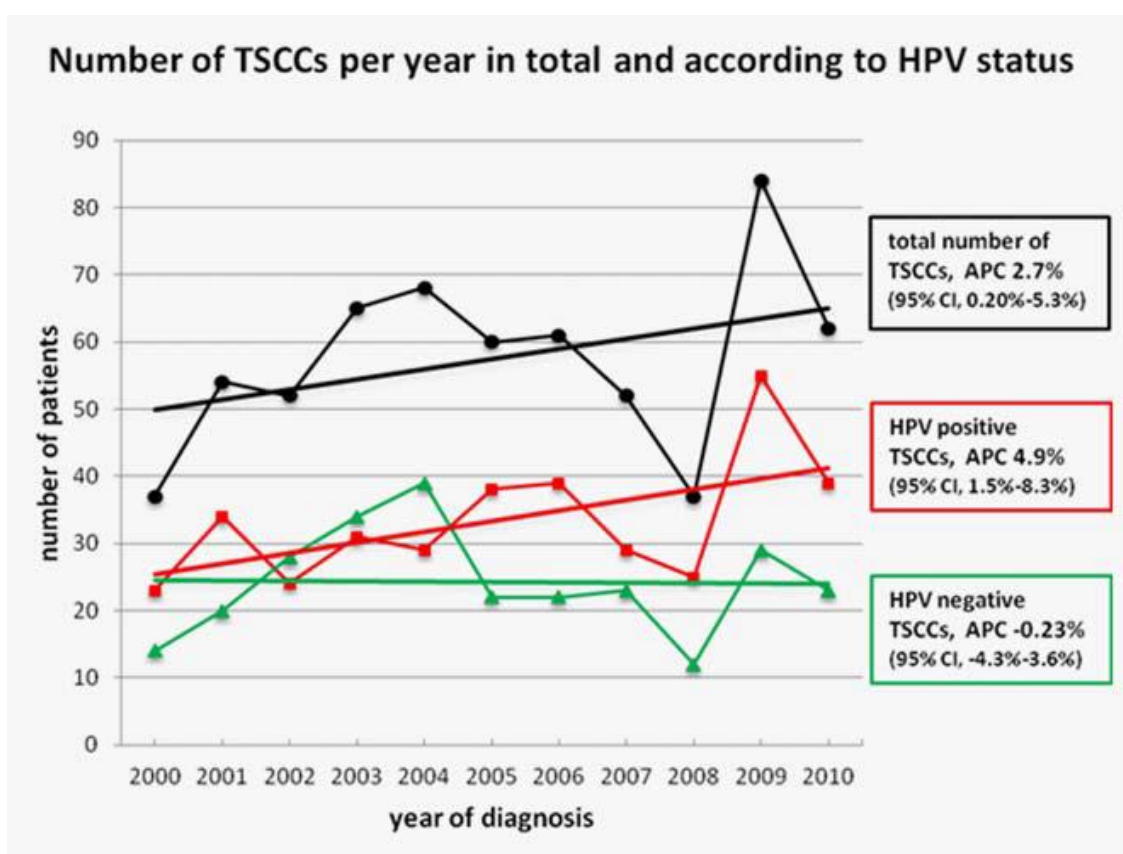


FIGURA 32: Gráfica donde se muestra el aumento en la incidencia de aparición de carcinomas de amígdala a expensas de los tumores HPV+ en una muestra de población danesa (tomada de Garnaes¹¹⁹).

Igualmente, en Finlandia también se ha descrito un incremento a lo largo de los años de la incidencia de carcinoma de orofaringe, tal como se aprecia en la siguiente figura⁵⁹.

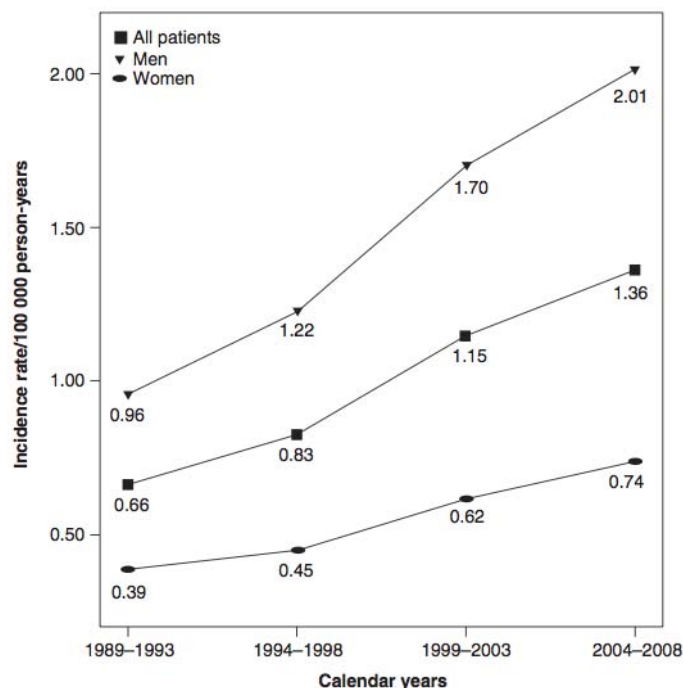


FIGURA 33: Gráfica donde se representa la tasa de incidencia de carcinoma de orofaringe en Finlandia entre los años 1989 y 2008. Datos obtenidos del “Finnish Cancer Registry” (tomada de Lundberg⁵⁹).

La incidencia de carcinomas de orofaringe en Finlandia se incrementó de una tasa de 0.66/100 000 casos-año durante el periodo 1989-1993 a una de 1.36 durante el periodo 2004-2008. Además, se incrementó la frecuencia relativa de los pacientes con tumores p16+ pasando de un 22% durante 1990-1999 a un 41% en el periodo 2000-2007.

En un estudio retrospectivo realizado en Noruega en el que se recogieron los casos incidentes de carcinomas de orofaringe durante el periodo 1992-2008, Ljokjel y cols¹²⁰ encontraron un incremento en el número de tumores HPV+. La incidencia de tumores HPV+ se incrementó desde los 0.34 casos/100,000 habitantes/año del periodo 1993-1998, a 1.0 casos/100,000 habitantes/año del periodo 2002- 2007.

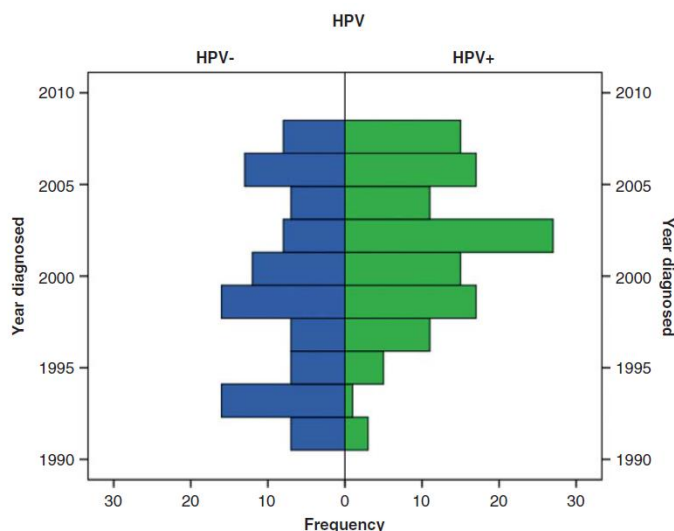


FIGURA 34: Gráfica que muestra el incremento de incidencia de carcinomas HPV+ (verde) mientras que la incidencia de los casos HPV- se mantiene constante (tomada de Ljokjel¹²⁰).

Por el contrario, la incidencia de casos HPV- se mantuvo bastante constante durante el periodo de estudio.

St Guily y cols¹²¹ llevaron a cabo un estudio en 12 centros franceses distribuidos por todo el país analizando la incidencia del HPV en carcinomas de orofaringe y cavidad oral. Los autores analizaron un total de 523 tumores, un 60% de los cuales se encontraban localizados en la orofaringe. La prevalencia global de HPV+ fue del 46.5% para los carcinomas de orofaringe, y del 10.5% para los de cavidad oral, siendo superior para las pacientes del sexo femenino (63.5% vs 42.2% in orofaringe y 17.2% vs 8.0% en cavidad oral). El genotipo más frecuente fue el HPV-16, que apareció en el 89.7% y 95.5% de los tumores HPV+ localizados en la orofaringe y la cavidad oral.

En otros ámbitos geográficos, fuera de Europa y Estados Unidos, se ha observado que la prevalencia de penetración del HPV en los carcinomas de orofaringe es igualmente significativa. Por ejemplo, en un estudio realizado en Japón¹²² sobre una muestra de 157 pacientes con tumores de orofaringe, la determinación mediante PCR demostró una positividad frente al HPV en un 50.3% de los pacientes.

Sin embargo, los datos correspondientes a estudios realizados en estado español muestran que la frecuencia de aparición de carcinomas de orofaringe HPV+ es más reducida. Recientemente Cerezo y cols^{60,123} han evaluado la

frecuencia de tumores de orofaringe HPV+ en cuatro hospitales universitarios de Madrid entre los años 2000 y 2008. Se analizaron un total de 93 tumores, considerando la positividad inmunohistoquímica frente a p16^{INK4A} como un marcador de infección viral. El porcentaje de tumores p16+ fue del 26,5%. De acuerdo con sus resultados, los pacientes HPV+ fueron más jóvenes, con una media de edad de 56 vs 59 años ($p=0.052$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos de HPV + y HPV – en función del sexo, antecedentes en el consumo de tabaco o extensión del tumor.

En otro trabajo publicado recientemente, Rodrigo y cols⁶¹ analizó la tendencia hacia la positividad HPV en 248 pacientes con carcinomas de orofaringe (amígdala y base de lengua) tratados quirúrgicamente durante el periodo 1990-2009 en Asturias. Se llevó a cabo un estudio de la presencia de ADN viral mediante PCR e hibridación in situ, así como una determinación de la positividad inmunohistoquímica frente a la p16. El porcentaje de pacientes p16+ fue del 12% ($n=30$). De los pacientes p16+, sólo en 8 ocasiones (3.2%) se comprobó mediante PCR la existencia de infección viral, que se correspondió con un HPV-16 en la totalidad de los casos. El estudio de hibridación demostró positividad en siete de los casos PCR+, y en un caso adicional en un paciente p16-. Los autores encontraron un incremento no significativo en la incidencia de aparición de tumores HPV+, que pasaron de un 1.3% durante el periodo 1990-1999 a un 6.1% en el periodo 2000-2009. La presencia de HPV se correlacionó inversamente con el consumo de tabaco y alcohol ($p<0.001$).

Resultados del estudio HSP.

De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, el porcentaje de pacientes con carcinomas de la orofaringe HPV+ fue del 12.0%, porcentaje que se incrementó al 16.7% si se consideraba tan sólo a los pacientes con tumores localizados a nivel amigdalario. Tal como se ha señalado en la Introducción y en la revisión de los datos publicados en la literatura, el porcentaje de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ es muy variable dependiendo de las áreas geográficas de procedencia de los pacientes, con una tendencia para los países del norte de Europa y Norte-América para contar con una mayor proporción de pacientes HPV+. Los elementos que podrían justificar esta disparidad son, por

una parte la reducción en el consumo de tabaco a lo largo de las últimas décadas en estos países con proporciones altas de carcinomas HPV+, lo que haría disminuir el número y en consecuencia la proporción de tumores HPV-, y por otra un incremento real de la incidencia de carcinomas relacionados con el HPV a partir de la extensión de la infección.

Nuestros datos se enmarcan en un área geográfica con una proporción limitada de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+. Los datos de los estudios publicados hasta la fecha señalan que la frecuencia de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ en el estado español es baja en relación con otros países desarrollados. Si bien el uso de tabaco y alcohol ha disminuido en el estado español a lo largo de las últimas décadas para la población del sexo masculino, se ha incrementado en la del sexo femenino¹²⁴. Por otra parte, la penetración de la infección por HPV en el estado español es relativamente baja en relación a la existente en otros países. En una revisión de diferentes estudios epidemiológicos llevado a cabo en mujeres de diversas ciudades del mundo, una de las cifras más bajas en la frecuencia de aparición de infección HPV a nivel cervical correspondió a la ciudad de Barcelona¹²⁵. De todas formas, es posible que los cambios en los hábitos de conducta sexual acontecidos a lo largo de los últimos años hayan podido modificar los patrones de penetración de la infección HPV en nuestro entorno.

Unos estudios realizados recientemente en Madrid y Asturias encontraron unas frecuencias de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ del 26.5% y del 3.2%, respectivamente^{60,61,123}. El tipo de determinación utilizado para la valoración HPV entre ambos estudios (p16 versus PCR e HIS), así como la procedencia de las muestras de pacientes incluidos en la realización de estos estudios (pacientes tratados con radioterapia versus tratados con cirugía), podría justificar las diferencias en la frecuencia de pacientes HPV+ aparecida entre ambos estudios. Nuestros resultados, con una prevalencia del 12.0%, incluyendo la totalidad de pacientes de los que se dispuso de muestra, independientemente del tipo de tratamiento realizado, se sitúan entre los publicados hasta ahora en las series de pacientes analizadas en el estado español.

Al igual que sucede en la mayoría de los autores que han analizado los cambios en la incidencia de aparición de tumores HPV+ a lo largo del tiempo, pudimos observar una tendencia que, si bien no alcanzaba la significación estadística, indicaba un incremento en la proporción de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ a lo largo del periodo de estudio. Desconocemos si este aumento en la proporción de pacientes HPV+ es debido a un incremento en la infección HPV a nivel de las vías aerodigestivas, a una disminución en la incidencia de aparición de tumores relacionados con el tabaco y el alcohol, o a otros factores. Son necesarios más estudios que constaten la existencia de cambios en las tendencias epidemiológicas en los pacientes con CECC en nuestro entorno geográfico.

Nuestros resultados coinciden con los de la totalidad de los autores en indicar el papel altamente predominante del genotipo HPV-16 en la carcinogénesis de los tumores orofaríngeos. Un 87.2% de nuestros pacientes HPV+ contaron con el genotipo 16 como responsable.

Encontramos diferencias significativas en el porcentaje de pacientes con tumores HPV+ en función de la sub-localización del tumor dentro de la orofaringe. Los pacientes con tumores localizados en la amígdala o la base de la lengua contaron con unos porcentajes de tumores HPV+ significativamente superiores a los localizados en paladar y pared posterior (16.7% y 11.2% versus 8.0% y 3.6%, respectivamente, $p=0.023$).

Igualmente, de acuerdo con los hallazgos de la mayoría de los autores, el perfil epidemiológico de los pacientes HPV+ fue significativamente diferente al de los pacientes HPV-. El porcentaje de pacientes con tumores HPV+ fue significativamente superior en las pacientes del sexo femenino (32.4% versus 9.9%, $p=0.0001$), contando los pacientes HPV+ con una mayor proporción de casos en los que no se reconocía el antecedente de tabaquismo (38.3% versus 4.1%, $p=0.0001$) o el consumo de alcohol (42.6% versus 8.7%, $p=0.0001$). Analizados en conjunto los consumos de alcohol y tabaco, un 88.4% de los pacientes HPV- reconocían el antecedente de consumos importantes de tabaco (>20 cigarrillos/día) y/o alcohol (> 80 gr/día), en tanto que el porcentaje se redujo a un 42.6% en el caso de los pacientes HPV+ ($p=0.0001$). Por el contrario, no

aparecieron diferencias significativas en nuestra serie de pacientes en la edad de aparición del tumor en función del estatus HPV.

Cabe destacar que, de los pacientes con CECC localizados fuera de la orofaringe analizados de forma aleatorizada y que fueron diagnosticados y tratados en nuestro centro durante el mismo periodo en que se llevó a cabo el estudio de los pacientes con carcinomas de orofaringe, ninguno mostró positividad frente al HPV, demostrando la existencia de una susceptibilidad diferencial a la infección y probabilidad de progresión tumoral asociada al virus en función de la localización de las mucosas dentro de las vías aerodigestivas superiores.

Variantes histológicas de los tumores HPV+

Revisión de la literatura.

La utilización cada vez más extendida de las determinaciones de positividad frente a HPV en pacientes con carcinomas de la orofaringe ha permitido descubrir el hecho de que con una cierta frecuencia los tumores HPV+ discrepan en la morfología habitual de los CECC. En ocasiones los tumores HPV+ adoptan un aspecto morfológico que se asemeja a determinadas variantes de carcinoma, como puedan ser los carcinomas papilares, basaloides o la variante nasofaríngea de los carcinomas linfoepiteliales.

Jo y cols¹²⁶ revisaron 31 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello de tipo papilar, pudiendo evidenciar que más de dos tercios de los pacientes contaron con positividad frente a la p16, y en un 68% de los casos fue posible la identificación mediante PCR de genotipos HPV de alto riesgo. La mayoría de los tumores HPV+ se localizaron a nivel de la región amigdalal y base de lengua, si bien aparecieron casos en el tracto nasosinusal y en la laringe.

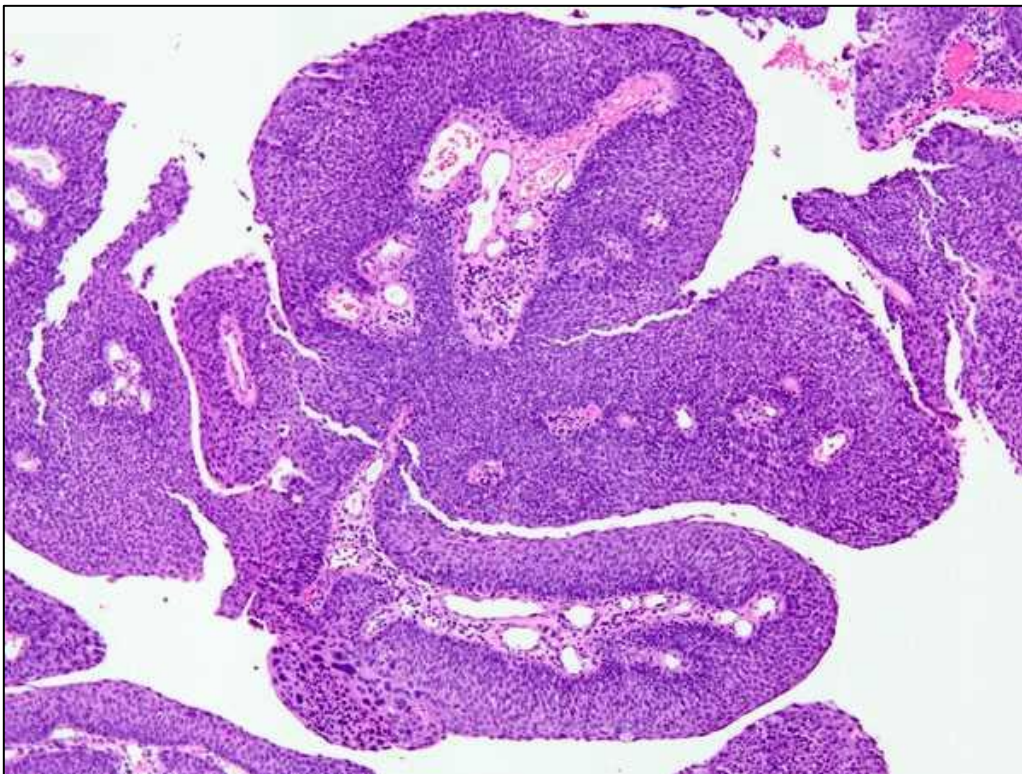


FIGURA 35: *Histología de una muestra de carcinoma de cabeza y cuello tipo papilar (tomada de Jo¹²⁶).*

Otra de las variantes morfológicas que de forma característica se ha asociado a la infección HPV es la basaloide. Begum y cols¹²⁷ analizaron un total de 53 pacientes con carcinomas escamosos basaloides, 21 de localización orofaríngea y los 32 restantes en localizaciones fuera de la orofaringe. Los tumores orofaríngeos se localizaron de forma preferente en la base de la lengua y la amígdala palatina (20 casos). Mediante una técnica de hibridación pudo detectarse la presencia de HPV-16 en un 34% de las muestras. Aparecieron diferencias significativas en el porcentaje de positividad frente al HPV-16 en función de la localización del tumor. El HPV-16 se detectó sólo en un 6% de los tumores localizados fuera de la orofaringe, en tanto que para los de localización orofaringe el porcentaje de positividad alcanzó el 76% ($p < 0.0001$).

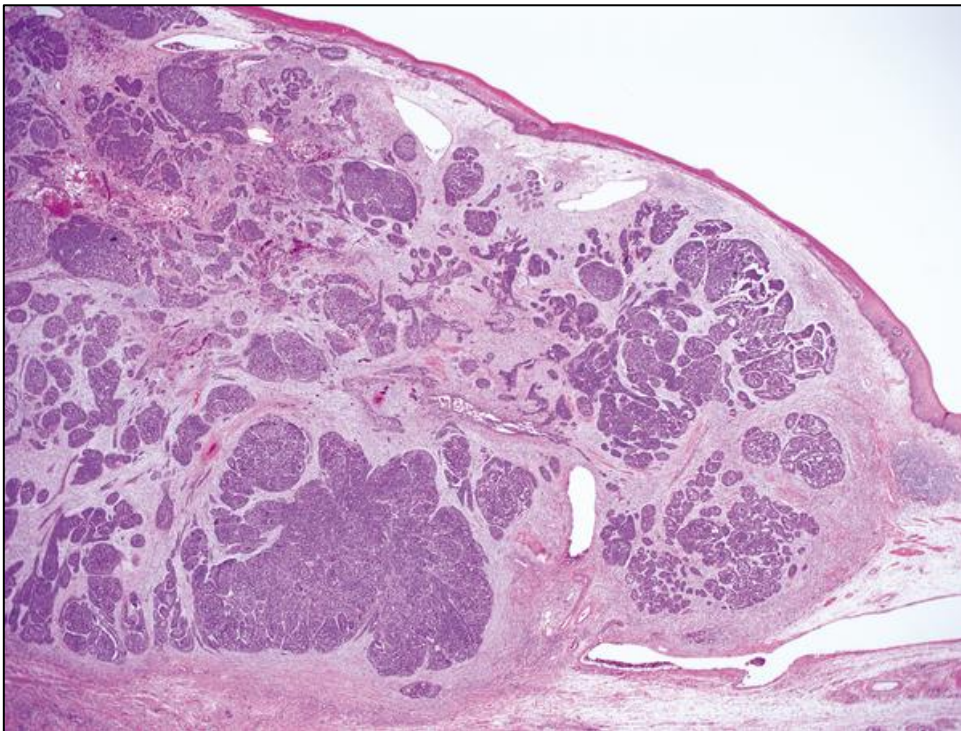


FIGURA 36: Histología de una muestra de carcinoma de orofaringe de tipo basaloide (tomada de Begum¹²⁷).

Discusión

Finalmente, otra variedad histológica que se ha asociado a la infección por HPV es la de los linfopiteliomas (carcinomas indiferenciados de tipo nasofaríngeo). Singhi y cols¹²⁸ identificaron un total de 22 pacientes con carcinomas HPV+ con morfología de linfopitelioma, de los cuales 19 contaron con una localización orofaríngea y en 3 ocasiones correspondieron a metástasis cervicales sin un tumor primario conocido. Las células tumorales contaban con un citoplasma sincitial, núcleos vesiculares y un gran nucleolo central, dispersas sobre un fondo de células inflamatorias en forma de células aisladas o agrupaciones celulares. Los estudios de hibridación in situ demostraron positividad inmunohistoquímica frente a p16 en la totalidad de ocasiones, negatividad frente al virus de Epstein-Barr, y positividad frente a HPV-16 en un 86% de los casos.

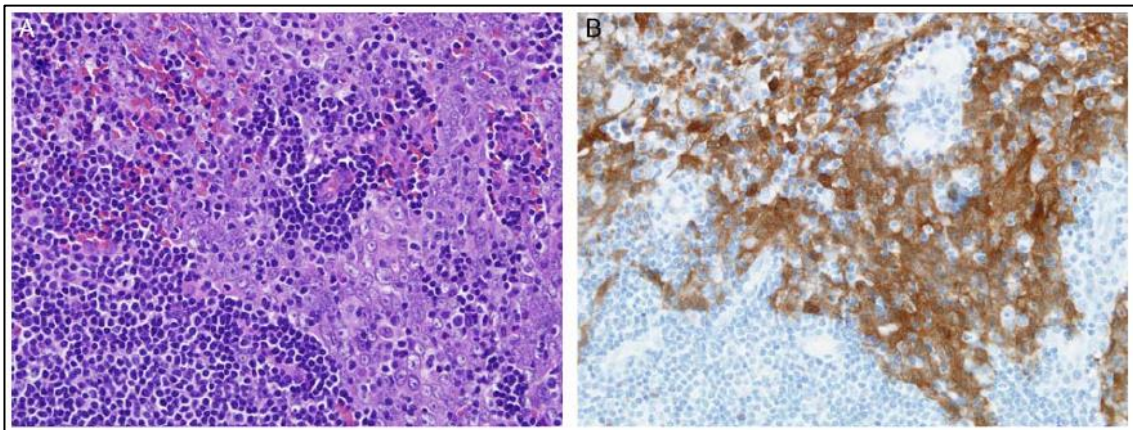


FIGURA 37: Muestra histológica de un linfopitelioma de orofaríngea (A) y misma muestra con inmunotinción para p16 (B) (tomada de Singhi¹²⁹).

Además, la morfología de las metástasis ganglionares de los pacientes HPV+ puede diferir de la de los pacientes HPV-. De acuerdo a las características radiológicas, los tumores pueden contar con un aspecto quístico (A), necrótico (B) o sólido (C).



FIGURA 38: TC de metástasis ganglionares en pacientes con carcinoma de orofaringe (A) aspecto quístico, (B) aspecto necrótico, (C) aspecto sólido (tomada de Goldenberg¹²⁹).

Las metástasis ganglionares de los pacientes HPV+ contarían con la tendencia a adoptar unas características quísticas. Goldenberg y cols¹²⁹ analizaron 20 pacientes con metástasis quísticas, definidas como la presencia de una masa ovoide con una cápsula de menos de 2 mm y un contenido quístico homogéneo y fluido, sin áreas irregulares o sólidas en el interior, a diferencia de las metástasis ganglionares con necrosis intranodal. Los pacientes con metástasis quísticas contaron con tumores primarios localizados en la base de la lengua en 10 ocasiones, la amígdala en 7, y en tres casos fueron metástasis ganglionares sin tumor primario conocido. Se dispuso de muestra histológica en 15 ocasiones, que demostró positividad frente a HPV-16 a partir de un estudio con PCR en 13 casos (87%). Se evaluó la presencia de HPV en 21 pacientes con metástasis necróticas, sin que en ningún caso apareciera positividad.

En otro estudio desarrollado en pacientes con carcinomas de orofaringe N+, Morani y cols¹³⁰ encontraron igualmente una relación significativa entre la presencia de metástasis ganglionares de características quísticas y la positividad frente a la infección por HPV.

Yasui y cols¹³¹ evaluaron un total de 255 pacientes con CECC N+. Ninguno de los pacientes con tumores no orofaríngeos mostró la presencia de adenopatías metastáticas quísticas, en tanto que la incidencia de metástasis de morfología quística fue del 6% para los pacientes con tumores orofaríngeos (5/82) y del 11% para las metástasis con primario desconocido (3/27). En los cinco casos en pacientes con carcinomas orofaríngeos, el tumor se localizó en la amígdala o la base de la lengua. En relación con las metástasis sólidas o necróticas, las metástasis quísticas contaron con una mayor probabilidad de aparecer en tumores HPV+ (33% versus 75%, OR 6.2, IC 95%: 1.2-45.7, p=0.03).

Resultados del estudio HSP.

Al analizar las características morfológicas de los tumores analizados en nuestra serie se pudo evidenciar la existencia de diferencias en la distribución de las variantes histológicas de carcinoma en función del estatus HPV. Así, para los pacientes HPV- en un 95.6% de las ocasiones los carcinomas contaron con una morfología escamosa convencional, en tanto que para los pacientes HPV+ este porcentaje se redujo al 82.9%. Un 10.6% de los tumores HPV contaron con un aspecto basaloide, frente al 2.9% de los casos con tumores HPV-. Igualmente, los tumores de aspecto papilar o verrucoso contaron con una tendencia a aparecer de forma preferente en los pacientes con carcinomas HPV+.

Una valoración inmunohistoquímica de los tumores en función del estatus HPV permitió diferenciar dos patrones bien definidos. Por una parte, los carcinomas escamosos HPV-, con positividad frente a p53 y pRb, y por la otra los tumores HPV+ que contarían con una negatividad frente a la expresión de p53 y pRb.

No dispusimos de información respecto al aspecto radiológico de las metástasis ganglionares, por lo que no pudimos analizar este aspecto en nuestro grupo de pacientes.

Tratamiento y pronóstico

Revisión de la literatura.

A partir del año 2000 han sido muy numerosas las series que han analizado los resultados correspondientes a los pacientes con CECC en función del estatus HPV.

Gillison y cols¹³² fueron de los primeros autores en explorar la relación entre la infección por HPV en los CECC y en describir la existencia de cambios en el pronóstico de la enfermedad para aquellos pacientes HPV+. Los autores determinaron la presencia de HPV mediante PCR en 253 pacientes con CECC de diferentes localizaciones tratados durante el periodo 1987-1998 y tratados en Baltimore (USA). EL HPV fue detectado en el 25% de los pacientes (n=62), correspondiendo al genotipo HPV-16 el 90% de los casos positivos. El estudio de hibridación constató con la integración del genoma viral en los casos positivos. Los tumores con un mayor riesgo de positividad fueron los localizados en la orofaringe (57%, 33/60), especialmente aquellos con tumores localizados en las amígdalas palatinas o linguales (62%, 32/52). Desde un punto de vista histológico los tumores HPV+ contaron con una mayor tendencia a tratarse de tumores mal diferenciados o con morfología basaloide. Los pacientes recibieron un tratamiento preferente con cirugía o cirugía más radioterapia (66%), o bien radioterapia o quimioradioterapia (33%). La supervivencia global correspondiente a los pacientes HPV+ fue significativamente superior a la conseguida con los HPV- (HR 0.57, IC 95%: 0.34-1.0). De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, los pacientes HPV+ contaron con una reducción en el riesgo de muerte ajustada del 59% en relación a los HPV-. La siguiente figura muestra las curvas de supervivencia ajustada en función del estatus HPV.

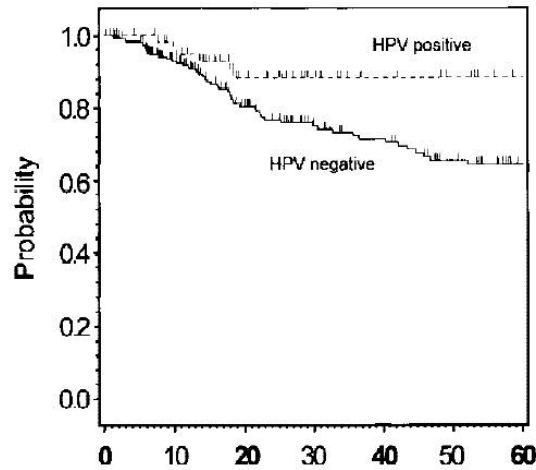


FIGURA 39: *Curvas de supervivencia ajustada en función del estatus HPV (tomada de Gillison¹³²).*

Igualmente el año 2000, Mellin y cols¹³³ presentaron los resultados correspondientes a 60 pacientes con carcinomas amigdalares tratados con cirugía y/o radioterapia entre 1984-1996 en Suecia, alcanzando unas conclusiones similares en relación a la capacidad pronóstica del estatus HPV. A partir de un estudio con PCR se determinó que un 43% de los pacientes eran HPV+, apareciendo el genotipo 16 en la totalidad de las ocasiones. Los pacientes HPV+ contaron con la tendencia a ser más jóvenes y con una mayor frecuencia de sexo femenino. La supervivencia ajustada fue significativamente mejor para los pacientes HPV+. La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes HPV+ fue del 53.5%, y para los HPV- del 31.5% (p=0.047).

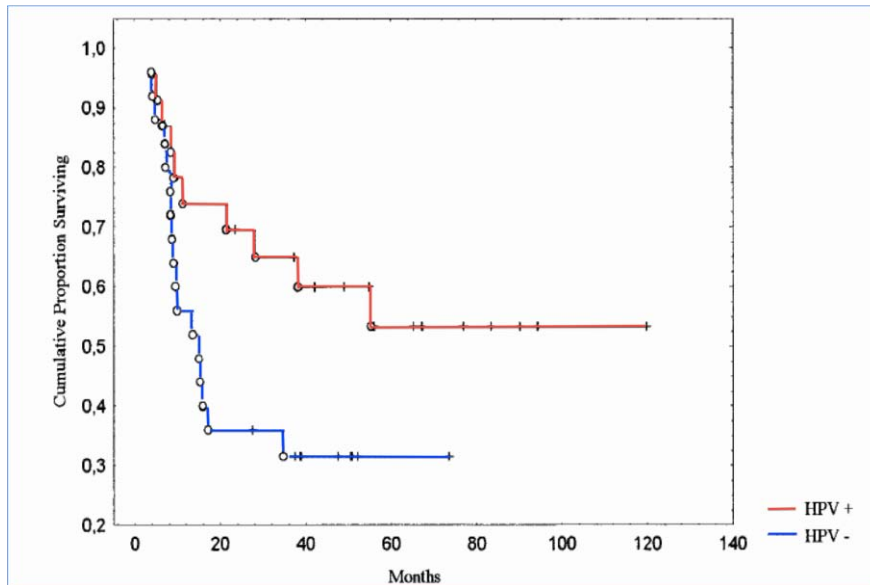


FIGURA 40: *Curvas de supervivencia ajustada en función del estatus HPV (tomada de Mellin¹³³).*

Los resultados de un estudio multivariante demostraron la capacidad pronóstica independiente del estatus HPV en relación con el control de la enfermedad y la supervivencia en los pacientes con carcinomas de la orofaringe.

Otros autores han realizado estudios de características similares, utilizando la positividad inmunohistoquímica frente a la p16 como un marcador subsidiario de la afectación HPV. Weinberger y cols¹³⁴ estudiaron mediante inmunohistoquímica 120 pacientes con carcinomas de orofaringe tratados con cirugía o radioterapia entre 1980 y 1999 en un centro de New Haven (USA), apareciendo como p16+ un 20% de los tumores. Los pacientes p16+ contaron con tumores con estadios más avanzados y peor diferenciados, a pesar de lo cual la supervivencia fue significativamente más favorable. La supervivencia libre de enfermedad a los 5 años para los pacientes p16+ fue del 62.2% y para los p16- del 18.5% ($p=0.0042$).

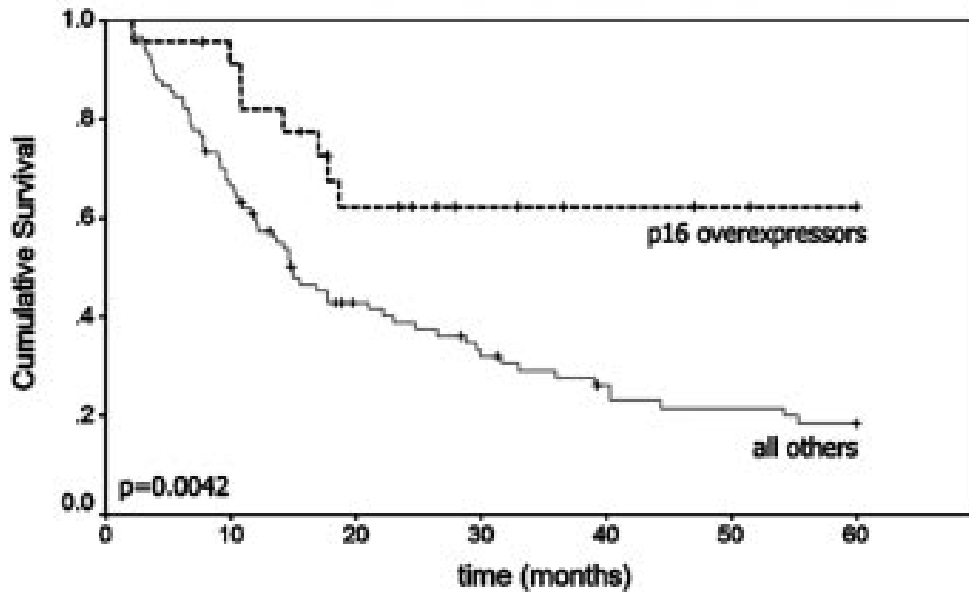


FIGURA 41: *Curvas de supervivencia ajustada en función de la sobreexpresión de p16 (tomada de Weinberger¹³⁴).*

Según los resultados de un análisis multivariante, sólo la expresión de p16 apareció como un factor pronóstico con capacidad independiente en relación con la supervivencia libre de enfermedad.

A partir de estos primeros trabajos han sido muy numerosos los estudios que han encontrado que la infección por HPV cuenta con una capacidad pronóstica significativa en los pacientes con CECC en general¹³⁵⁻¹⁴², o de forma más específica en el caso de los pacientes con carcinomas de orofaringe¹⁴³⁻¹⁴⁹.

El año 2010 Ang y cols¹⁵⁰ publicaron en New England Journal of Medicine los resultados de un estudio retrospectivo en que se analizaba la relación entre el estatus HPV y el pronóstico en pacientes con carcinomas de orofaringe en estadios avanzados. Los autores analizaron una cohorte de 323 pacientes con carcinomas de orofaringe incluidos en el ensayo clínico multicéntrico RTOG 0129 realizado en USA entre 2002-2005, en que se aleatorizaba a pacientes con carcinomas de orofaringe con estadios avanzados a un tratamiento con quimioradioterapia convencional o con fraccionamiento acelerado. El porcentaje de pacientes HPV+ evaluados mediante PCR fue del 63.7%. Los pacientes HPV+ eran pacientes más jóvenes, con una menor exposición al tabaco, mejor

estado general, y con tumores localmente menos avanzados, en tanto que la tasa de afectación ganglionar fue igual que para los pacientes HPV-.

Los pacientes HPV+ contaron con una mejor supervivencia global y libre de progresión. La supervivencia libre de progresión para los pacientes HPV+ a los 3 años fue del 73.7% (IC 95%: 67.7-79.8%) y para los HPV- del 43.4% (IC 95%: 34.4-52.4%) ($p < 0.0001$).

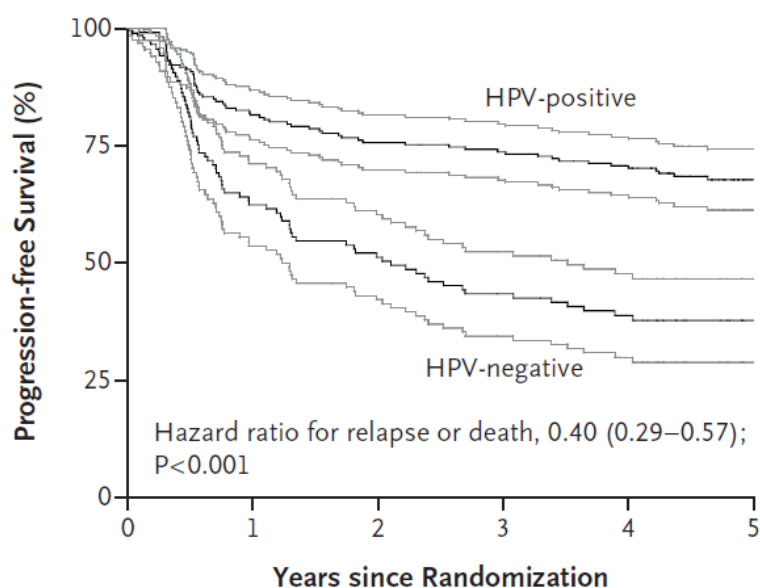


FIGURA 42: Curvas de supervivencia libre de progresión en función del estatus HPV (tomada de Ang¹⁵⁰).

De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, el estatus HPV apareció como una variable con capacidad pronóstica significativa. Al evaluar la supervivencia libre de enfermedad, el riesgo de recidiva para los pacientes HPV- fue 2.20 veces superior que para los HPV+ (IC 95%: 1.35-3.03, $p < 0.001$). Los pacientes HPV+ contaron con una reducción de la mortalidad del 58% en relación a los HPV-. Al utilizar la expresión de p16 mediante inmunohistoquímica como un marcador indirecto de la afectación HPV, los resultados fueron similares a los obtenidos al evaluar el estatus HPV con PCR.

Semrau y cols¹⁵¹ analizaron la capacidad pronóstica de la positividad frente a HPV en pacientes con carcinomas avanzados de orofaringe considerados como no resecables tratados con quimiorradioterapia. Un 25% de los 52 pacientes

evaluados fueron considerados HPV+ (p16+), contando estos pacientes con una supervivencia libre de enfermedad significativamente superior a la de los pacientes HPV- ($p=0.005$).

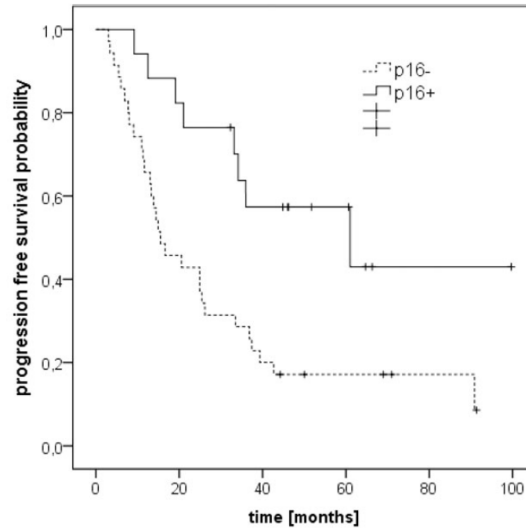


FIGURA 43: *Curvas de supervivencia libre de enfermedad en función de la sobreexpresión de p16 en pacientes con carcinomas avanzados de orofaringe (tomada de Semrau¹⁵¹).*

En contraposición a la capacidad pronóstica demostrada por el estatus HPV, otros factores estudiados como la expresión de la survivina, un marcador de apoptosis, ni del EGFR se relacionaron de forma significativa con la supervivencia de la enfermedad en este grupo de pacientes.

Chen y cols¹⁵² compararon en un estudio caso-control apareado el porcentaje de regresión tumoral tras la aplicación de un tratamiento con radioterapia en pacientes con carcinomas de orofaringe en función de la positividad frente al HPV. De acuerdo con los autores, los pacientes HPV+ contaron con una regresión significativamente más rápida del tumor durante las dos primeras semanas de tratamiento que la de los pacientes HPV-, en tanto que a partir de dicho periodo las tasas de regresión tumoral fueron independientes del estatus HPV.

La mayoría de los estudios que han evaluado la influencia del HPV en el pronóstico de la enfermedad en los pacientes con CECC son de naturaleza retrospectiva, en muchas ocasiones incluyendo pacientes tratados de forma heterogénea con cirugía o radioterapia. Lassen y cols¹⁵³ presentaron los resultados obtenidos a partir de un estudio prospectivo en que se analizaron los

resultados de 156 pacientes con carcinomas de faringe (n=109) o supraglotis (n=47) tratados con radioterapia durante el periodo 1986-1990 en Dinamarca, evaluados mediante inmunohistoquímica. Un 22% de los tumores expresaban la p16, siendo la orofaringe (n=74) donde el porcentaje de positividad fue más elevado, alcanzando el 32%. El control loco-regional a los 5 años para los pacientes p16+ fue del 58%, y para los p16- del 28% (p=0.0005). Este beneficio en el control loco-regional de la enfermedad para los pacientes p16+ tuvo su traducción en la supervivencia ajustada. La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes p16+ fue del 72%, disminuyendo al 34% para los pacientes p16- (p=0.0006).

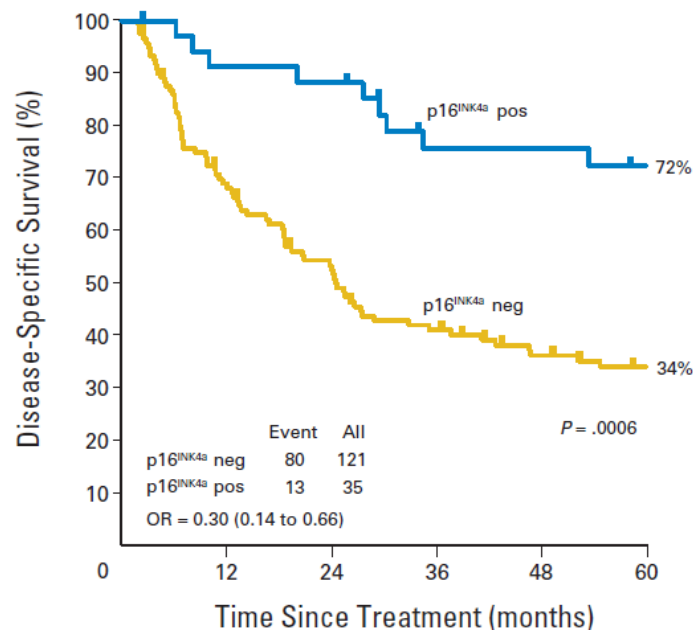


FIGURA 44: Curvas de supervivencia ajustada en función de la sobreexpresión de p16 (tomada de Lassen¹⁵³).

Los resultados de un estudio multivariante mostraron que el riesgo de fracaso loco-regional se relacionó con una categoría inicial en la extensión local del tumor T1-2 (HR: 0.56, IC 95%: 0.37-0.84), N0 (HR: 0.51, IC 95%:0.33-0.78), y p16+ (HR:0.35, IC 95%:0.19-0.64). Las mismas variables aparecieron como relacionadas con el pronóstico de la enfermedad al considerar la supervivencia ajustada o la supervivencia global.

Otros estudios realizados de forma prospectiva han confirmado la mejora en el pronóstico correspondiente a los pacientes con CECC HPV+¹⁵⁴.

Weinberg y cols⁹⁶ llevaron a cabo un estudio considerando el estatus de los pacientes tanto en relación con la expresión de la p16 estudiada mediante inmunohistoquímica, como de la presencia de HPV-16 a partir de PCR. Los autores evaluaron un total de 77 pacientes con carcinomas orofaríngeos tratados con cirugía o radioterapia entre 1980-1999 en New Haven (USA) y clasificaron a los pacientes en función de la positividad a p16 y HPV-16 en tres grupos.

		p16 Status	
		Nonoverexpressing	Overexpressing
HPV-16 DNA	Absent	Class I	—
	Present	Class II	Class III

FIGURA 45: Clasificación de los pacientes en función de la positividad a p16 y HPV-16 en tres grupos (tomada de Weinberg⁹⁶).

Treinta pacientes (39%) se incluyeron en la clase I, 20 (37%) en la clase II, y 18 (23%) en la clase III. La carga viral correspondiente a los pacientes de las clases II y III fue diferente, con un promedio de 3.6 copias en los pacientes de la clase II y 46.0 copias en los de la clase III. Los pacientes con tumores clase III contaron con estadios más avanzados, a expensas básicamente de la afectación regional.

La supervivencia libre de recidiva fue significativamente superior para los pacientes incluidos en la clase III. La supervivencia a los 5 años para los pacientes con tumores clase III fue del 75%, en tanto que para los pacientes con tumores clase I y II disminuyó al 15% y 13% respectivamente (p=0.025).

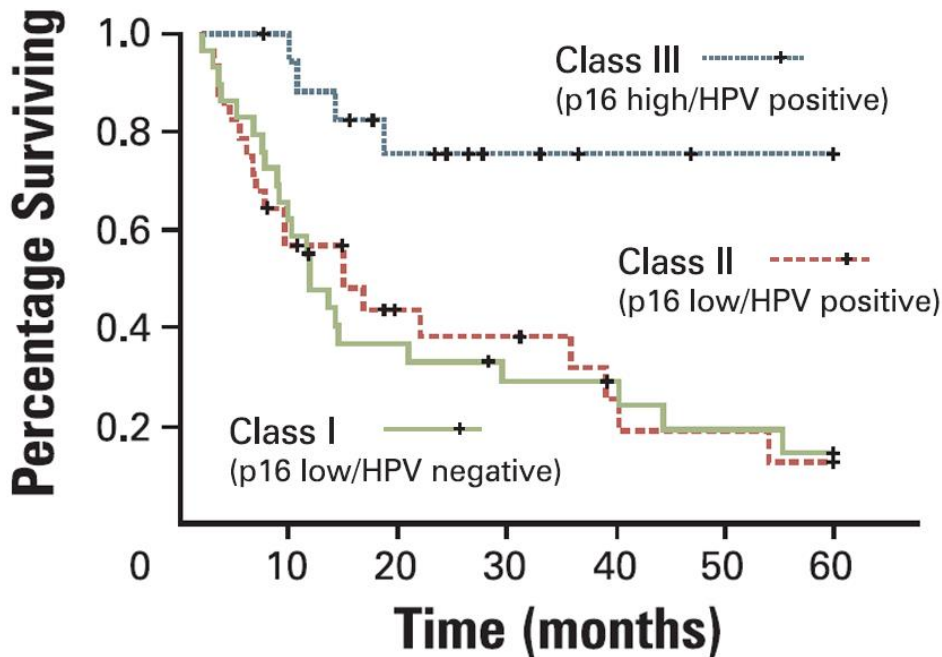


FIGURA 46: Curvas de supervivencia ajustada en los tres grupos según expresión de p16 (tomada de Weinberg⁹⁶).

El porcentaje de recidivas locales fue favorable para los pacientes con tumores clase III. El riesgo de recidiva local a los 5 años para los pacientes con tumores clase III fue del 14%, frente a un 45% para los de clase I y 74% para los de clase II ($p=0.027$). El análisis multivariante confirmó el valor pronóstico de ese modelo de clasificación.

En un estudio de características similares Smith y cols¹⁵⁵ obtuvieron unos resultados parecidos. Los autores estudiaron un total de 301 pacientes con CECC, analizando tanto la presencia de HPV mediante PCR como el nivel de expresión de p16 mediante inmunohistoquímica. Un 57% de los tumores se localizaron en la cavidad oral, un 30% en la orofaringe, y un 13% en laringe-hipofaringe. La p16 apareció expresada en un 35% de los tumores, siendo más elevado este porcentaje en los pacientes con tumores de orofaringe (65%) o cavidad oral (25%) en comparación con los de laringe-hipofaringe (12%). El HPV fue detectado en un 27% de casos, con una gran mayoría (95%) de HPV-16. Igualmente, la localización preferentes para la positividad frente al HPV fue la orofaringe (57%), seguida por la cavidad oral (15%) y la laringe-hipofaringe (10%). Al igual que sucedió en el estudio de Weinberg y cols⁹², los pacientes que contaron con un beneficio pronóstico fueron aquellos

HPV+/p16+, tal como muestra la siguiente figura en que aparecen las curvas de supervivencia ajustada en función del estatus de los pacientes.

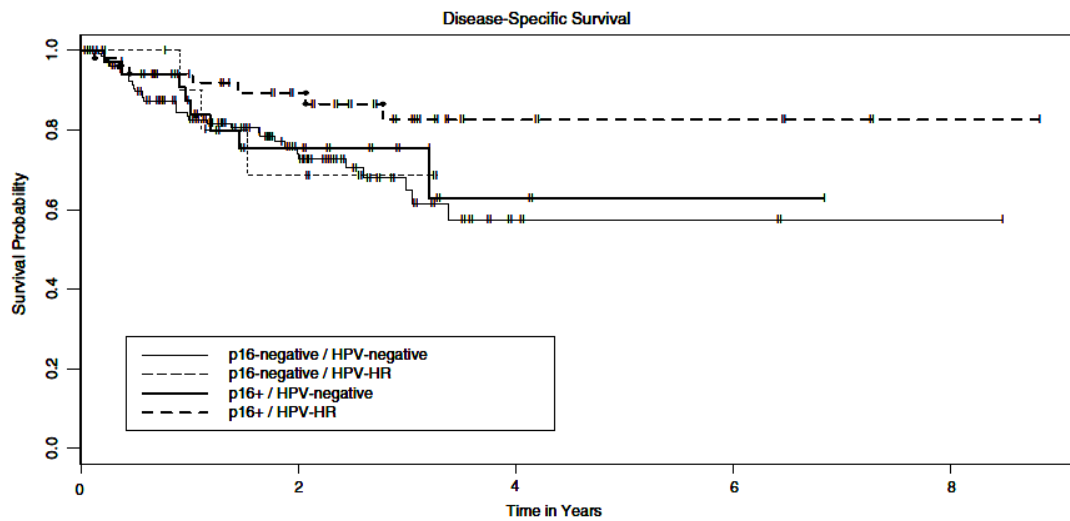


FIGURA 47: Curvas de supervivencia ajustada en función de la positividad al HPV y la expresión de p16 (tomada de Smith¹⁵⁵).

A partir de esta serie de estudios puede establecerse que sólo los tumores HPV+ en los cuales la vía carcinogénica implicaba una anulación funcional de Rb y la consiguiente expresión de p16 contaron con una ventaja pronóstica.

Además de determinar la presencia de HPV en el tumor, sería importante concretar la asociación biológica del virus con la promoción del tumor mediante el contaje del número de copias por célula, los niveles de expresión de las oncoproteínas E6/E7, la perturbación del control del ciclo celular dependiente de Rb, o el estado físico del virus (episómico o integrado).

Jung y cols¹⁵⁶ analizaron un grupo de pacientes con carcinomas de orofaringe en función del estatus HPV, evaluado mediante PCR, y la actividad transcripcional del mismo, evaluada a partir de la expresión de mRNA E6/E7. De acuerdo con sus resultados, el beneficio en el pronóstico sólo incluyó a los pacientes con un virus transcripcionalmente activo (HPV DNA+/RNA+), en tanto que el pronóstico para los pacientes con virus no activo (HPV DNA+/RNA-) fue similar al de los pacientes HPV-.

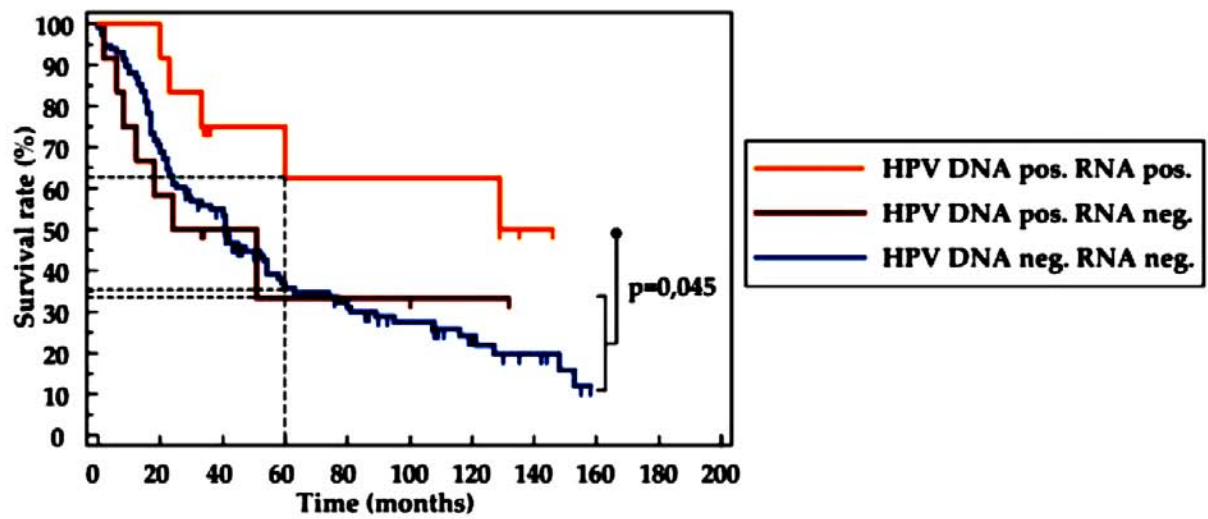


FIGURA 48: Curva de supervivencias ajustada en función de la positividad de ADN de HPV y la actividad transcripcional (tomada de Jung¹⁵⁶).

Analizando la expresión del gen CDKN2A (p16INK4A) pudo apreciarse un elevado nivel de correlación entre la expresión de este gen y la de los genes E6/E7, en tanto que los niveles de expresión en los tumores HPV DNA+ / RNA- no difirieron de forma significativa de los obtenidos en tumores HPV-.

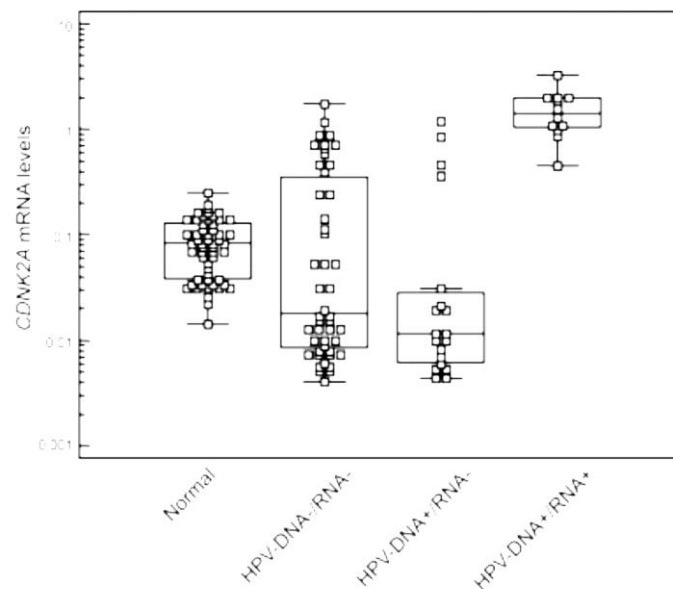


FIGURA 49: Expresión del gen CDKN2A en los grupos según HPV DNA y mARN E6/E7 (tomada de Jung¹⁵⁶).

En un análisis de las alteraciones cromosómicas, la pérdida de la región 16q apareció asociada a los tumores HPV+, en tanto que amplificaciones frecuentes en tumores HPV- como las de 11q13 o 3p25, aparecieron con una menor frecuencia en los tumores HPV+.

Smith y cols¹⁵⁷ analizaron la expresión de p53 mediante inmunohistoquímica y la presencia de HPV de alto riesgo mediante PCR en una cohorte de 294 pacientes con CECC tratados entre 1994-2004 en Iowa (USA). La p53 fue positiva en el 48% de los pacientes, y el HPV en un 27%. La frecuencia de positividad del HPV en función de la localización fue del 57% para los tumores orofaríngeos, 16% para los de cavidad oral, y 10% para los de laringe-hipofaringe. Al clasificar a los pacientes en función del estatus p53-HPV, un 11% fueron p53+/HPV+, un 35% p53-/HPV-, un 37% p53+/HPV- y un 16% p53-/HPV+. Existieron diferencias significativas en la supervivencia ajustada en función del patrón de expresión de los tumores, contando con mejor pronóstico los pacientes p53-/HPV+, en tanto que el peor resultado correspondió a los p53+/HPV-. Los pacientes p53+/HPV+ y los pacientes p53-/HPV- contaron con unos niveles de supervivencia intermedios, tal como aparece en la siguiente figura.

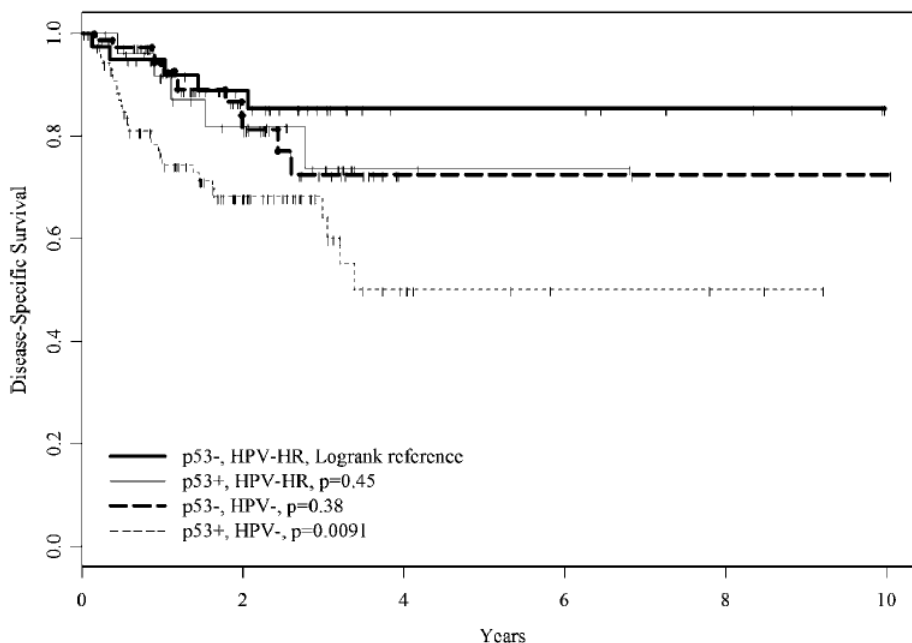


FIGURA 50: Supervivencia ajustada en función a la positividad a la p53 y la presencia de HPV de alto riesgo (tomada de Smith¹⁵⁷).

De nuevo la conclusión de los autores fue que la clasificación en función de la expresión conjunta de p53 y HPV contó con una mayor capacidad pronóstica, indicando la importancia del mecanismo carcinogénico de desarrollo del CECC en el resultado final.

Gao y cols¹⁵⁸ validaron la capacidad pronóstica del estatus HPV en una cohorte de 101 pacientes con carcinomas de orofaringe tratados con radioterapia o cirugía, de los cuales un 81% fueron HPV+. A partir de un análisis de 96 microRNA, definieron un modelo con capacidad predictiva basado en la expresión de 6 microRNA, tres de los cuales aparecían sobre-expresados y tres infra-expresados en el grupo de pacientes que sobrevivieron. Pudieron comprobar cómo su modelo basado en microRNA mantenía su capacidad pronóstica de forma independiente al estatus HPV.

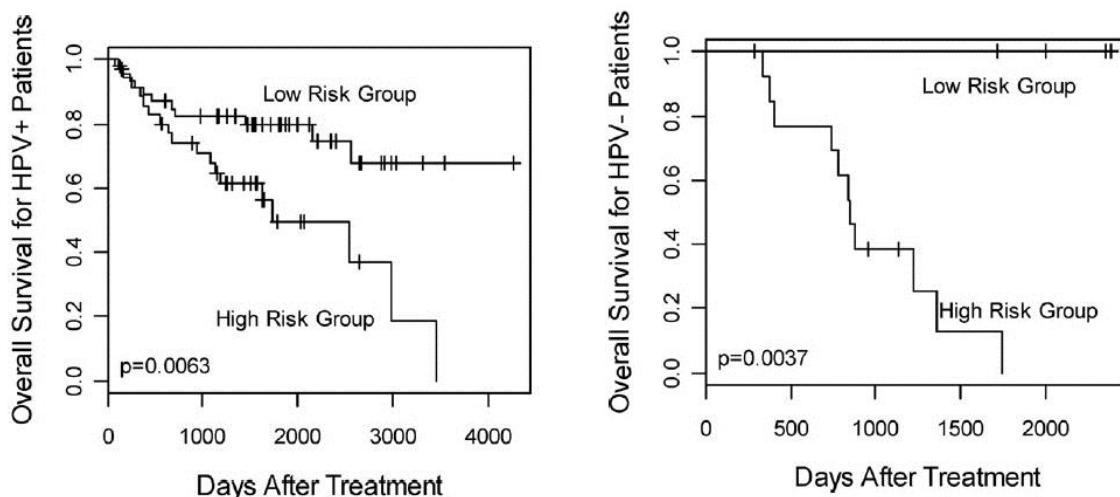


FIGURA 51: Curvas de supervivencia ajustada en los grupos de paciente divididos en función de la expresión de 6 microRNA estudiada por los autores, observan diferencias en la supervivencia independientes al estatus HPV (tomada de Gao¹⁵⁸).

Al incluir en un análisis multivariante el modelo basado en la expresión de microRNA y el estatus HPV pudo comprobarse como la infección HPV perdió su capacidad pronóstica (p=0.49), en tanto que el modelo microRNA la mantuvo (p<0.001).

De los 96 microRNA analizados, 5 se correlacionaron de forma significativa con el estatus HPV, y uno de ellos (miR-31) apareció relacionado tanto con la

infección HPV como con el pronóstico de la enfermedad, lo que justifica la pérdida en la capacidad pronóstica del estatus HPV en el estudio multivariante.

El beneficio pronóstico para los pacientes HPV parece independiente al tipo de tratamiento realizado. Diferentes series de pacientes tratados de forma homogénea con cirugía¹⁵⁹, cirugía y radioterapia postoperatoria¹³⁸, radioterapia^{140,141}, quimioradioterapia^{139,146,147,160} o bioradioterapia¹⁴⁸ encontraron un mejor pronóstico en cuanto al control de la enfermedad y la supervivencia en función del status HPV de los pacientes.

Fischer y cols¹⁶¹ analizaron el significado pronóstico de la afectación HPV en función del tipo de tratamiento utilizado en pacientes con carcinomas de orofaringe. Los autores incluyeron 57 pacientes tratados con cirugía ± radioterapia postoperatoria, y 25 pacientes tratados con radioterapia o quimioradioterapia. Para ambos grupos de pacientes, la positividad de la p16 mostró una tendencia a la mejoría en la supervivencia ($p=0.067$ y $p=0.096$ respectivamente).

Igualmente, Saito y cols¹⁶² analizaron una cohorte de 124 pacientes con carcinomas de orofaringe diagnosticados en Japón, de los cuales un 30% mostraron positividad frente al HPV evaluada a partir de inmunohistoquímica (p16).

Los autores mostraron una mejoría significativa en la supervivencia ajustada correspondiente a los pacientes p16+. La supervivencia a los 3 años para los pacientes p16- fue del 47.2%, y para los p16+ alcanzó el 82.9%.

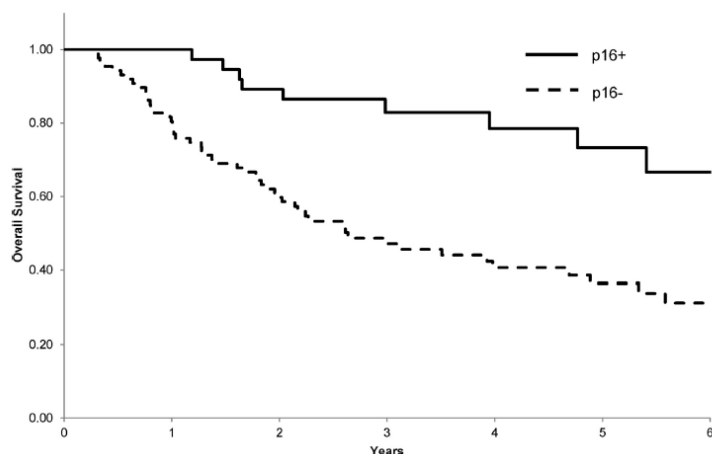


FIGURA 52: Supervivencia ajustada en pacientes p16+ y p16 – (tomada de Saito¹⁶²).

El beneficio en supervivencia para los pacientes p16+ apareció de forma independiente al tratamiento realizado, ya fuese quirúrgico o radioterápico. De acuerdo con un estudio multivariante, la variable que se relacionó de forma más significativa con la supervivencia ajustada fue el estatus HPV. En relación a los pacientes p16+, el hazard ratio en cuanto a supervivencia para los pacientes HPV- fue de 0.34 (IC 95%: 0.16-0.70, $p=0.003$).

En un estudio realizado sobre 226 pacientes con carcinomas de orofaringe, Ljokjel y cols¹²⁰ no encontraron diferencias en cuanto a la extensión local del tumor en función del estatus HPV, en tanto que los pacientes HPV+ contaron con una mayor probabilidad de afectación ganglionar. Los pacientes HPV+ tuvieron un mejor pronóstico, independientemente del tipo de tratamiento realizado. La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes HPV+ fue del 77%, y para los HPV- del 53% ($p<0.001$).

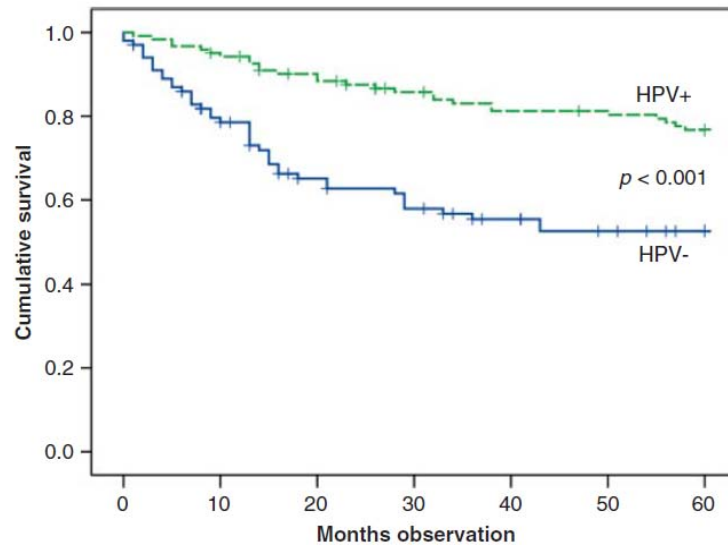


FIGURA 53: Supervivencia ajustada en pacientes HPV+ y HPV- (tomada de Ljokjel¹²⁰).

Los autores pudieron constatar como este beneficio en la supervivencia apareció a expensas de los pacientes con tumores localizados en la base de lengua y región amigdalal, no apareciendo diferencias significativas para los pacientes con tumores situados fuera de estas localizaciones.

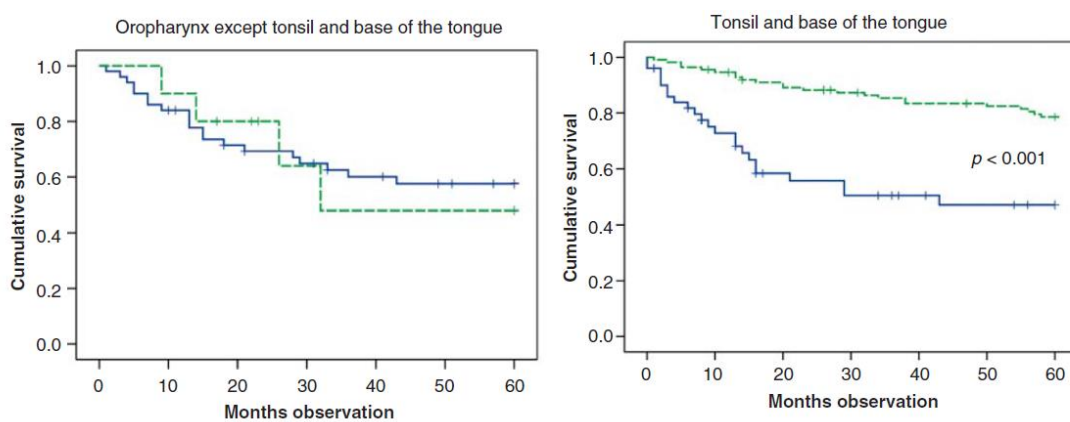


FIGURA 54: Diferencia de la supervivencia ajustada en pacientes HPV+ y HPV- en tumores localizados en orofaringe excepto en base de lengua y región amigdalal, y en tumores localizados en base de lengua y región amigdalal en (tomada de Ljokjel¹²⁰).

En un trabajo reciente, Pajares y cols¹⁶³ analizaron los resultados obtenidos en 108 pacientes con CECC con estadios avanzados (estadios III-IV) tratados con quimiorradioterapia o biorradioterapia (radioterapia-cetuximab). Un total de 22 pacientes (20.3%) contaron con positividad frente a HPV, y 18 (16.7%) con inmunohistoquímica positiva para la p16. Los autores encontraron que los pacientes p16+ contaron con un mejor pronóstico que los p16-, alcanzando las

diferencias en supervivencia significación estadística en el caso de los pacientes con carcinomas de orofaringe.

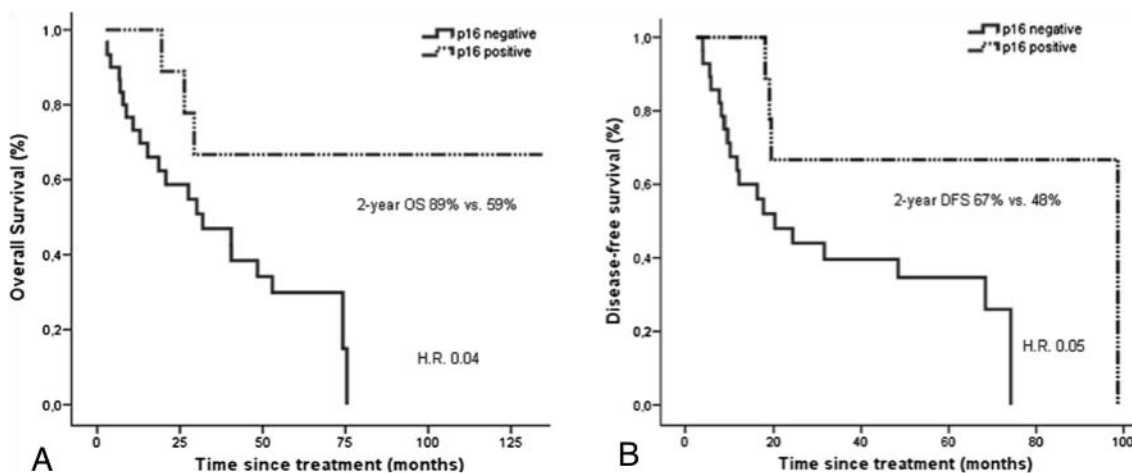


FIGURA 55: Curva de supervivencia global (A) y supervivencia libre de enfermedad (B) en función del estatus HPV en pacientes con carcinomas avanzados de orofaringe (tomada de Pajares¹⁶³).

Al analizar de forma independiente los pacientes HPV+, los autores pudieron apreciar un beneficio en el control de la enfermedad y en la supervivencia para los pacientes que habían recibido tratamiento con bioradioterapia. Los pacientes p16+ tratados con bioradioterapia contaron con una supervivencia observada y ajustada a los 2 años significativamente superior a la correspondiente a los pacientes tratados con quimioradioterapia, tal como muestra la siguiente figura.

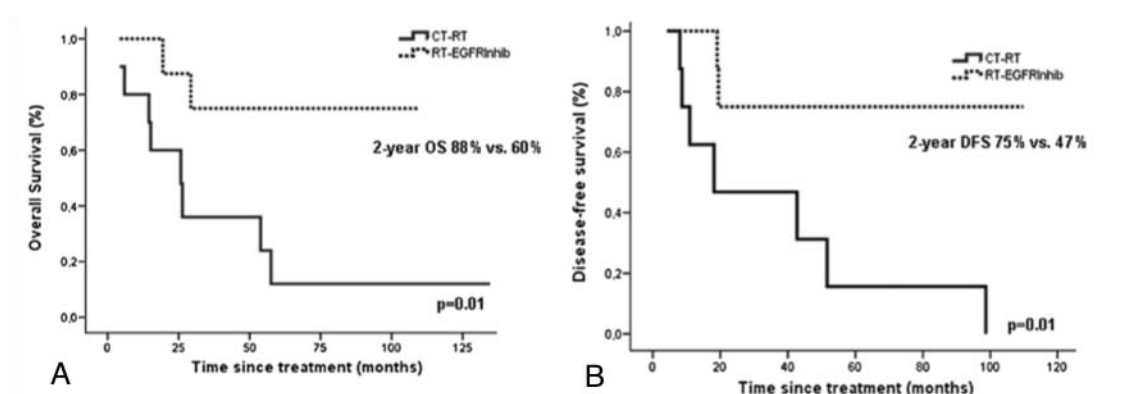


FIGURA 56: Curvas de supervivencia global (A) y supervivencia libre de enfermedad (B) en pacientes p16+ en función del tratamiento recibido, bioradioterapia o quimioradioterapia (tomada de Pajares¹⁶³).

Por el contrario, no aparecieron diferencias en los patrones de supervivencia en función del tipo de tratamiento recibido para los pacientes con tumores p16-, tal como se muestra en la figura.

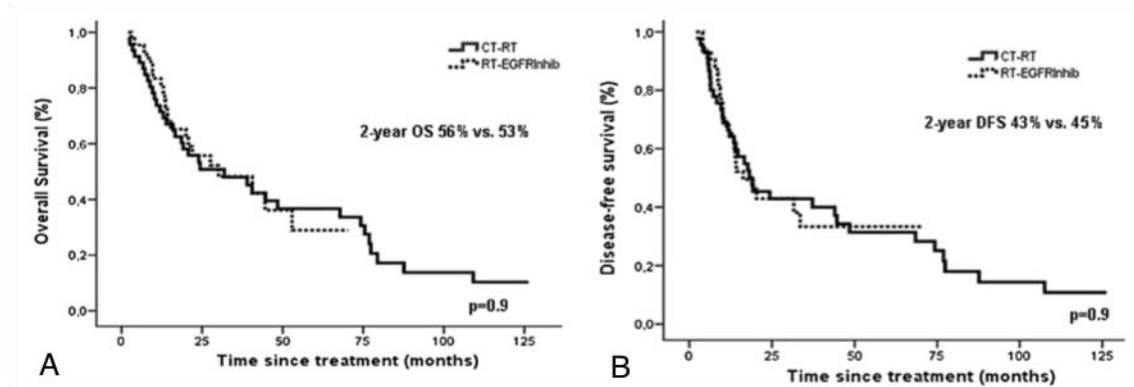


FIGURA 57: Curvas de supervivencia global (A) y supervivencia libre de enfermedad (B) en pacientes p16- en función del tratamiento recibido, bioradioterapia o quimioradioterapia (tomada de Pajares¹⁶³).

Este beneficio en supervivencia se ha analizado también en variantes morfológicas del carcinoma escamoso que ocasionalmente aparecen en pacientes HPV+. Begum y cols¹²⁷ analizaron la supervivencia correspondiente a una cohorte de pacientes con carcinomas escamosos de tipo basaloides, un 34% de los cuales resultaron positivos frente a HPV-16, preferentemente en el caso de los tumores de localización orofaríngea. De acuerdo con sus resultados, la supervivencia observada correspondiente a los tumores basaloides HPV+ fue significativamente superior a la obtenida con los pacientes con tumores HPV-.

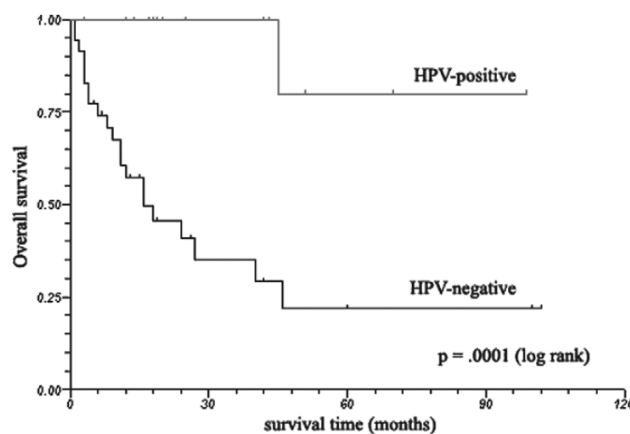


FIGURA 58: Supervivencia ajustada en pacientes con tumores basaloides HPV+ y HPV- (tomada de Begum¹²⁷).

Sin embargo, no todos los autores coinciden en la independencia del tipo de tratamiento utilizado en relación al beneficio pronóstico ofrecido por la infección HPV. Sethi y cols¹⁶⁴ analizaron los resultados correspondientes a 385 pacientes con CECC incluidos en el Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System entre 1999-2007. La prevalencia de tumores HPV+ determinada mediante PCR fue del 29.4%, siendo significativamente superior en la amígdala (60.5%) o la base de la lengua (46.4%) que en el resto de las localizaciones ($p < 0.0001$). De acuerdo con los resultados presentados por los autores, el beneficio en la supervivencia correspondiente a los carcinomas de orofaringe HPV+ se produjo a expensas de los pacientes tratados con radioterapia. La supervivencia correspondiente a los pacientes HPV+ tratados con radioterapia fue significativamente superior que la de los HPV-, en tanto que no aparecieron diferencias significativas en los pacientes sometidos a tratamiento quirúrgico.

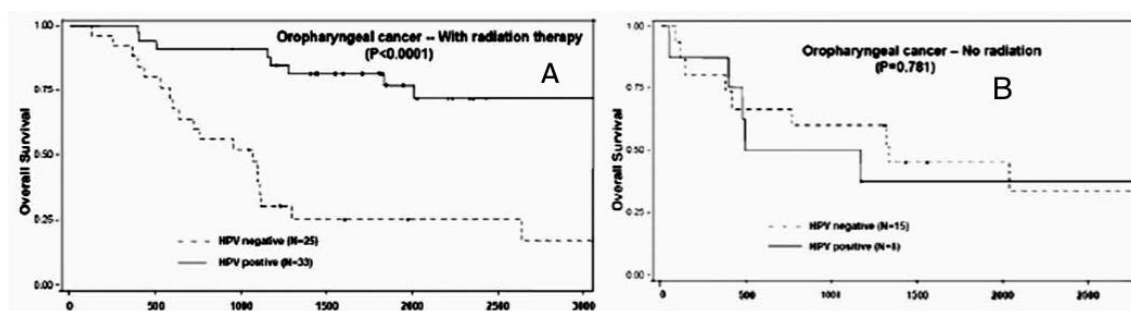


FIGURA 59: Supervivencia ajustada en pacientes HPV+ y HPV- tratados con radioterapia (A) o tratados con cirugía (B) (tomada de Sethi¹⁶⁴).

López y cols¹⁶⁵ analizaron el pronóstico de los pacientes con CECC en función del estatus HPV en una región con prevalencia baja de infección. Los autores analizaron los resultados de dos estudios multicéntricos realizados en Brasil durante el periodo 1998-2008, incluyendo todas las localizaciones de cabeza y cuello. Se analizaron un total de 398 pacientes para los cuales se dispuso de muestra tumoral fresca o parafinada, determinando la presencia de HPV mediante PCR. La prevalencia global de HPV en la muestra analizada fue del 8.8%, y para el HPV-16 del 3.5%. La frecuencia de casos HPV-16+ fue superior en el sexo femenino, en pacientes más jóvenes y sin antecedente en el uso de tóxicos. Además, se dispuso de una muestra de suero de los pacientes, que demostró que los niveles de concordancia entre DNA HPV-16 y la titulación

serológica al analizar el global de pacientes fue baja. Esta concordancia aumentó al considerar los pacientes con carcinomas de orofaringe. Los autores encontraron una relación significativa entre la seropositividad frente al HPV-16 y la supervivencia global para los pacientes con carcinomas de orofaringe.

Por el contrario, la seropositividad frente a HPV no influyó de forma significativa en el pronóstico al considerar el resto de localizaciones de cabeza y cuello (cavidad oral, hipofaringe y laringe).

Lin y cols¹⁶⁶ analizaron los factores predictores de supervivencia asociados a los tumores de orofaringe HPV+. Los autores analizaron una cohorte de 157 pacientes tratados en el periodo 1997-2008 en el Johns Hopkins Hospital (Maryland, USA), tratados de forma quirúrgica (51%) o con radioterapia o quimio-radioterapia (49%). De acuerdo con los resultados de un análisis multivariante, las variables que se relacionaron con un empeoramiento en la supervivencia global fueron la edad del paciente (incremento en el hazard ratio de 2.33 por cada incremento en la edad de 10 años, IC 95%: 1.05-5.16, p=0.038), una categoría de extensión local avanzada (HR 5.78, IC 95%: 1.60-20.8, p=0.007), una categoría baja de afectación ganglionar (N0-N1) (HR 4.94, IC 95%: 1.53-16.0, p=0.007), y una persistencia en el consumo de tabaco (HR 4.38, IC 95%: 1.07-18.0, p=0.04). Al analizar la supervivencia libre de enfermedad, las variables que aparecieron como significativas en el estudio multivariante fueron la categoría de extensión local de la enfermedad (HR 8.32, IC 95%: 3.06-23 p<0.0001), y el consumo de alcohol (HR 13, IC 95%: 1.33-120, p=0.03).

Hipotéticamente, uno de los motivos que podría justificar el mejor pronóstico de los pacientes HPV+ sería una menor incidencia de afectación ganglionar. Sin embargo, estudios realizados en pacientes con CECC han demostrado que el riesgo de afectación ganglionar en el momento del diagnóstico para los pacientes HPV+ sería similar^{144,150} o incluso aumentado^{96,167} en relación a los pacientes HPV-.

A partir de un estudio realizado en pacientes con carcinomas amigdalares, Straetmans y cols¹⁶⁷ concluyeron que si bien un porcentaje sustancial de los

pacientes HPV+ contaban con afectación ganglionar, ésta perdía capacidad como factor pronóstico de supervivencia en este grupo de pacientes.

Igualmente, Ward y cols¹⁶⁸ encontraron como la afectación ganglionar perdía relevancia como factor pronóstico en los pacientes con carcinoma de orofaringe HPV+. Estos autores analizaron una cohorte de 266 pacientes con carcinomas de orofaringe tratados en diferentes hospitales de la región de Londres durante el periodo 2000-2010, clasificando como HPV+ los tumores con hibridación y p16 positivas. Resultaron HPV+ un 54.6% de los tumores. Los pacientes HPV+ contaron con un estadio más avanzado (estadio III-IV en HPV+ 93.2% versus 64.7% en HPV-, $p>0.001$), especialmente a expensas de una mayor afectación a nivel regional (89.8% de N+ en tumores HPV+ versus 56.3% en HPV-, $p<0.001$), en tanto que prácticamente no aparecieron diferencias en relación a la categoría de extensión local T. La afectación regional apareció como un factor pronóstico significativo para los pacientes HPV-, en tanto que no contó con capacidad pronóstica en los pacientes HPV+, tal como muestran las siguientes figuras que representan la supervivencia ajustada en función de la afectación regional en relación al estatus HPV.

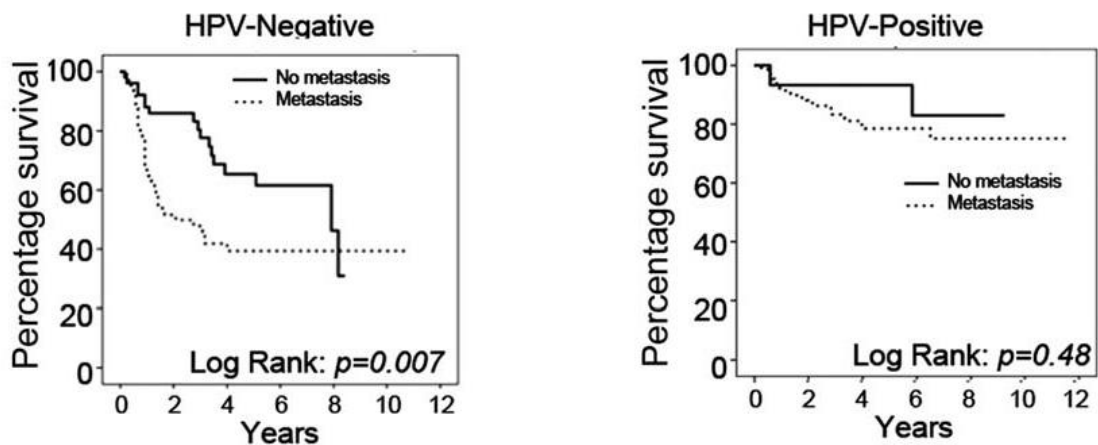


FIGURA 60: Supervivencia ajustada en pacientes HPV – y en pacientes HPV+ en función de sus metástasis ganglionares (tomada de Ward¹⁶⁸).

De manera inversa, la categoría de extensión local no se relacionó con la supervivencia en el caso de los tumores HPV-, en tanto que mostró una relación altamente significativa en el caso de los HPV+.

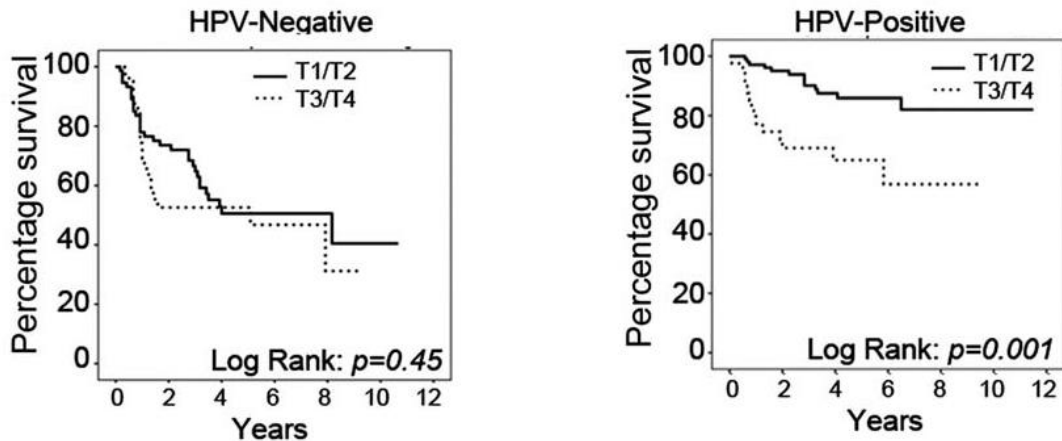


FIGURA 61: Supervivencia ajustada en pacientes HPV – (A) y en pacientes HPV+ (B) en función de la extensión local (tomada de Ward¹⁶⁸).

De acuerdo con estos resultados, los autores cuestionan la capacidad pronóstica del sistema de clasificación TNM actual para los pacientes con carcinomas de orofaringe.

Igualmente, a partir del análisis de 88 pacientes con carcinomas de orofaringe p16+ tratados con radioterapia, Mackenzie y cols¹⁶⁹ encontraron una relación significativa entre la categoría de extensión local de la enfermedad (T1-2 versus T3-4) y el control loco-regional y a distancia de la enfermedad.

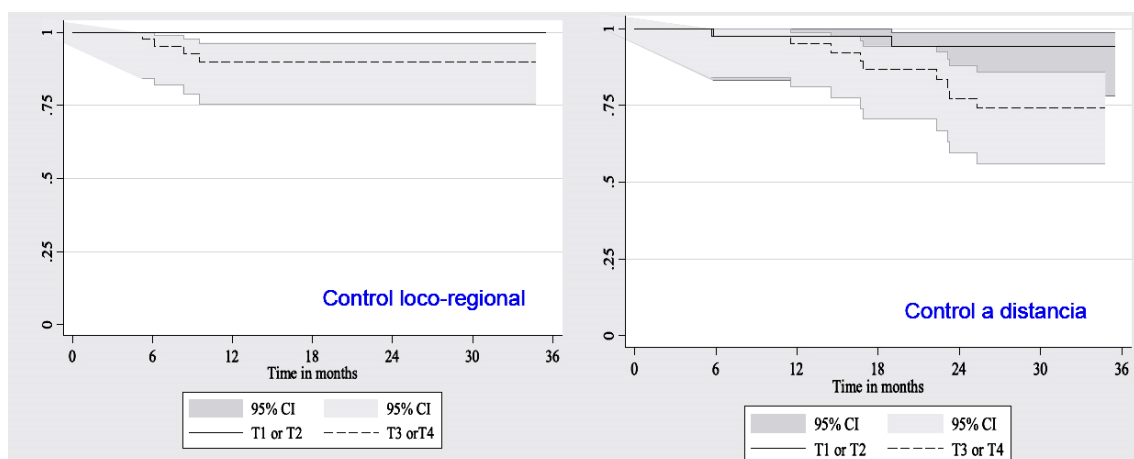


FIGURA 62: Curvas de control loco-regional y control a distancia en función a la extensión local del tumor en pacientes HPV+ tratados con radioterapia (tomada de Mackenzie¹⁶⁹).

A partir del análisis de una cohorte de 156 pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ con metástasis ganglionares (N+) tratados con

quimio-radioterapia, Spector y cols¹⁷⁰ han propuesto una modificación en la estadificación regional para los pacientes con carcinomas HPV+. De acuerdo con los criterios de estos autores, esta clasificación contaría con una mayor capacidad pronóstica que el TNM actual. Los autores proponen categorizar la afectación regional en función del tamaño de las adenopatías metastásicas (superior o inferior a 6 cm), su número y lateralidad, y la presencia de un conglomerado adenopático. Este nuevo criterio de conglomerado adenopático queda definido a partir del estudio radiológico como la existencia de 3 o más ganglios agregados con pérdida del plano graso intermedio y con evidencia radiológica de ruptura capsular. A partir de estos criterios, proponen una clasificación de los pacientes como HPV+N1 para pacientes con una adenopatía única homolateral o contralateral, o una única adenopatía en cada uno de los lados del cuello, en todos los casos con diámetro inferior a 6 cm. Definen como HPV+N2 los pacientes con una adenopatía única mayor de 6 cm, o ≥ 2 adenopatías ipsi o contralaterales, sin la presencia de un conglomerado adenopático. Finalmente, la categoría HPV+N3 la conformarían los pacientes con un conglomerado adenopático.

La siguiente figura esquematiza la clasificación propuesta por los autores en contraposición a la clasificación TNM convencional.

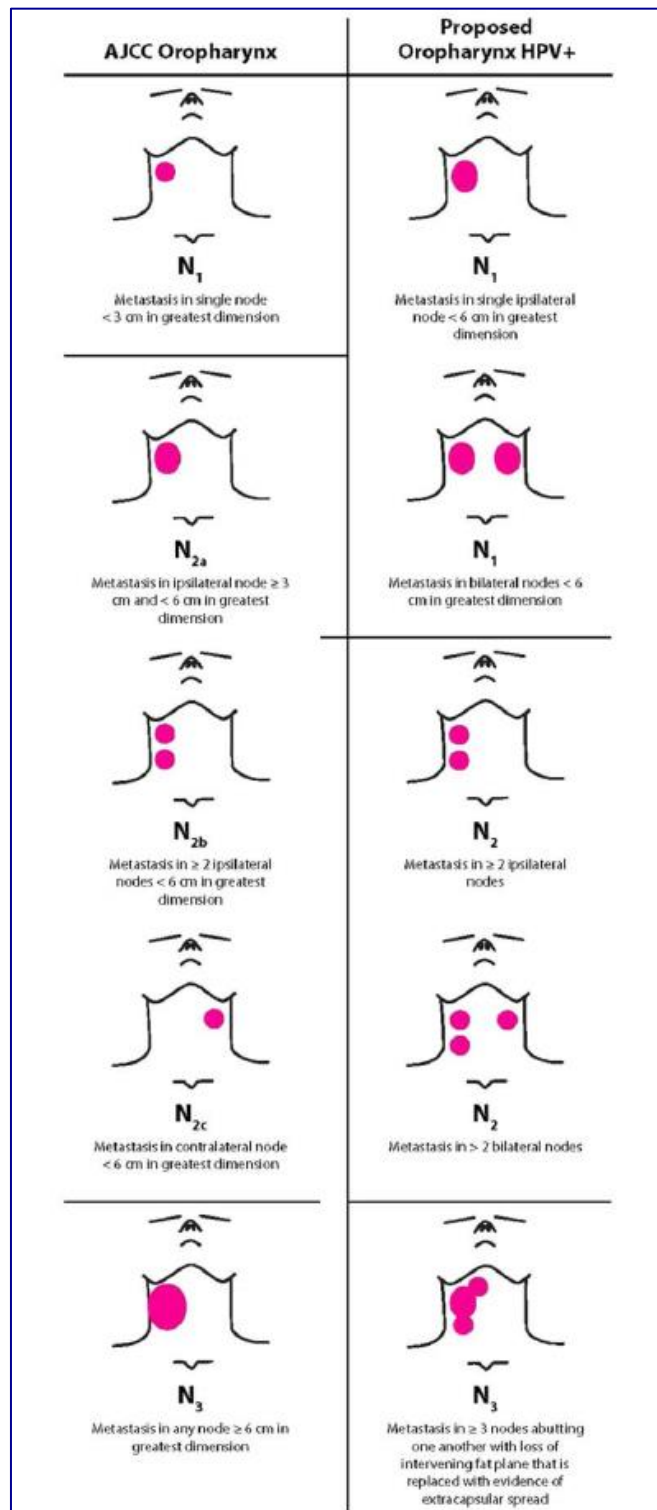


FIGURA 62: Clasificación pronóstica, en pacientes con carcinoma de orofaringe HPV+, propuesta por Spector¹⁷⁰ en contraposición a la clasificación TNM convencional.

No aparecieron diferencias significativas en la supervivencia actuarial observada ($p=0.16$) o ajustada ($p=0.14$) para los pacientes incluidos en el estudio al clasificarlos en función de la categoría de extensión regional de acuerdo con el sistema de clasificación TNM convencional, tal como se aprecia en la siguiente figura.

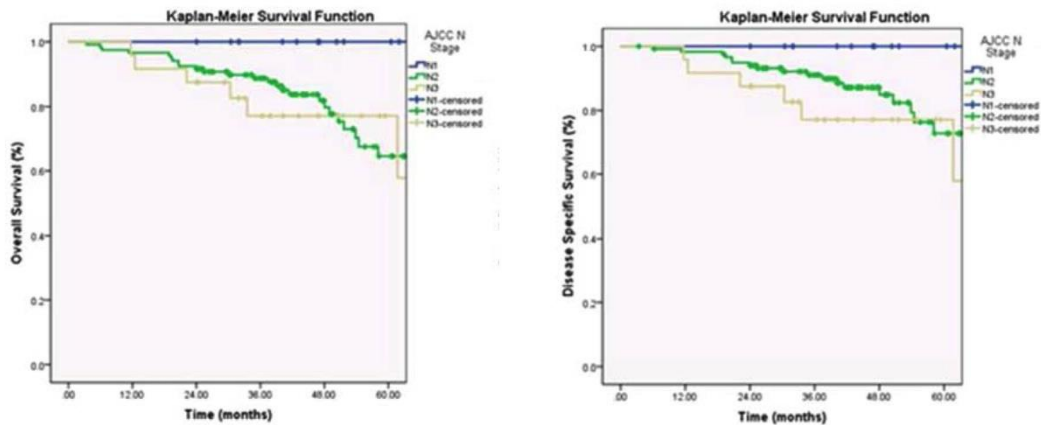


FIGURA 63: Supervivencia actuarial observada y ajustada en función del TNM convencional en pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ (tomada de Spector¹⁷⁰).

Por el contrario, la clasificación específica HPV+N consiguió una discriminación significativa de las supervivencias observada ($p=0.0001$) y ajustada ($p=0.0001$).

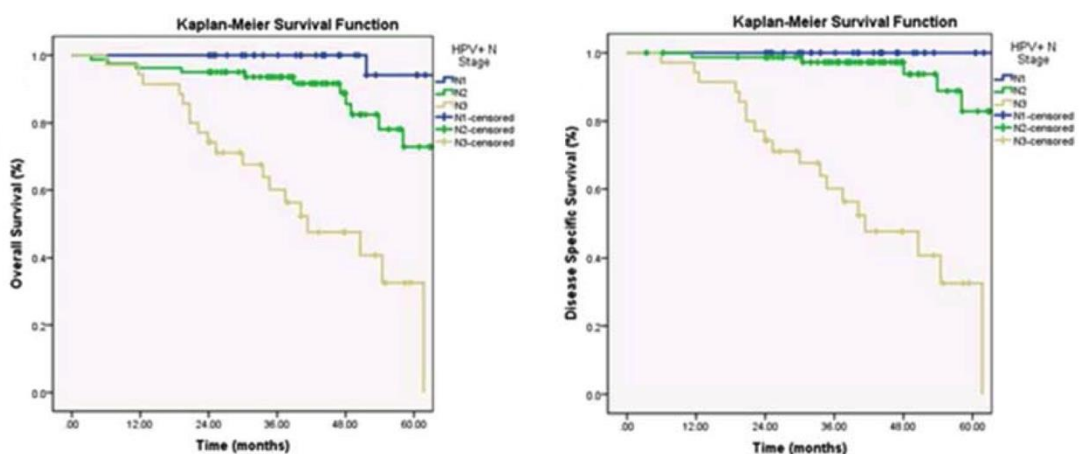


FIGURA 64: Supervivencia actuarial observada y ajustada en función de la clasificación específica HPV+N (tomada de Spector¹⁷⁰).

Los autores compararon también la capacidad pronóstica de ambas clasificaciones mediante un modelo multivariante, pudiendo concluir que la clasificación HPV+N contó con una mejor capacidad pronóstica que el TNM convencional. A partir de estos resultados, y en función de la validación de la clasificación propuesta, los autores consideran apropiado llevar a cabo una revisión de los criterios de clasificación de la categoría de extensión regional para los pacientes HPV+.

Joo y cols¹⁷¹ analizaron la relación entre el estatus HPV, la afectación regional, y el grado de infiltración en un grupo de 66 pacientes con carcinomas de orofaringe y 90 pacientes con carcinomas de cavidad oral. El porcentaje de pacientes con HPV de alto riesgo para los pacientes con carcinomas de orofaringe fue del 27.3%, significativamente superior que el correspondiente a los carcinomas de cavidad oral, que fue sólo del 6.7% ($p < 0.001$). Apareció una correlación significativa entre la positividad HPV y la afectación regional para los pacientes con carcinomas orofaríngeos. De los 27 pacientes con adenopatías metastásicas el porcentaje de HPV+ fue del 48.1%, y para los 39 pacientes NO del 12.1% ($p = 0.002$). Igualmente se identificó una relación entre la positividad HPV y la profundidad de infiltración en los carcinomas de orofaringe. Los pacientes HPV+ contaron con una profundidad de invasión significativamente superior a la correspondiente a los pacientes HPV-, tal como aparece en la siguiente figura.

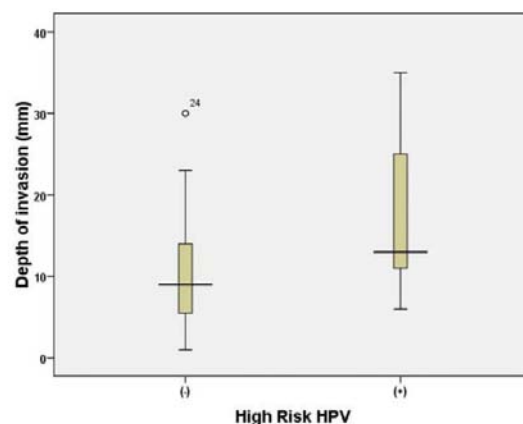


FIGURA 65: Gráfica que representa la profundidad de invasión del carcinoma en pacientes HPV- (menor) y en pacientes HPV+ (mayor) (tomada de Joo¹⁷¹).

Todos los pacientes incluidos en el estudio recibieron un tratamiento quirúrgico, con radioterapia adyuvante en función de los hallazgos anatomopatológicos. A pesar de la mayor infiltración y porcentaje de afectación regional, los pacientes HPV+ contaron con una mayor supervivencia ajustada ($p=0.035$).

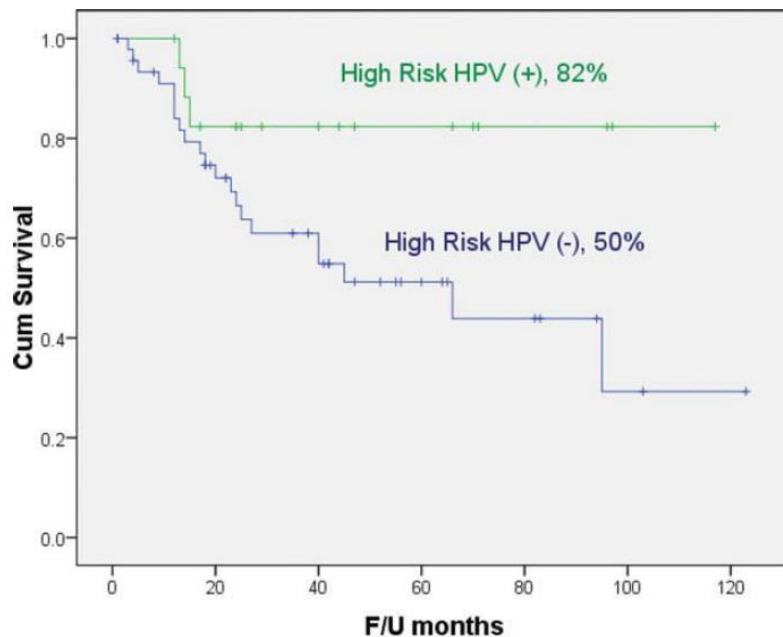


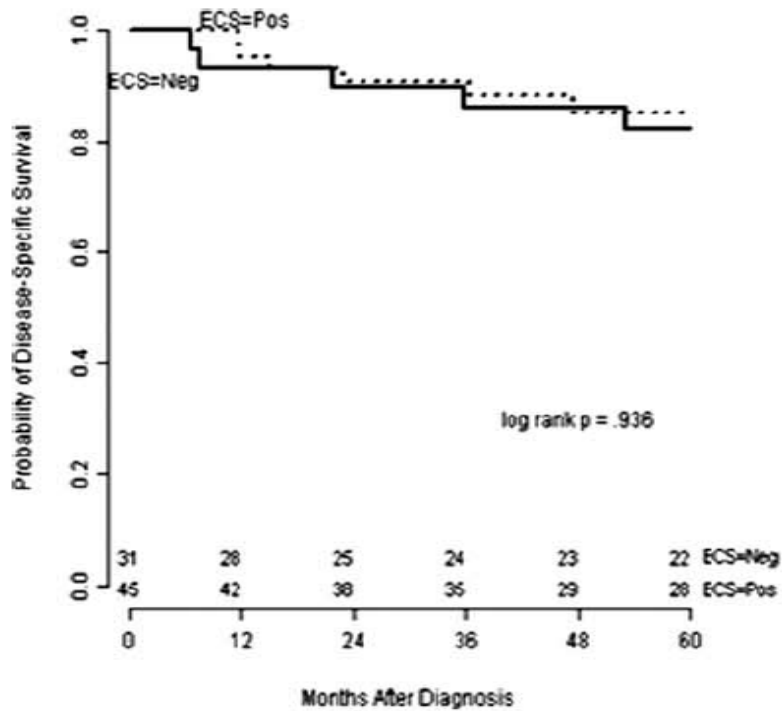
FIGURA 66: Supervivencia ajustada en pacientes HPV+ y en pacientes HPV- (tomada de Joo¹⁷¹).

Para los pacientes con carcinomas de cavidad oral no aparecieron diferencias significativas en el porcentaje de afectación regional ni la profundidad de infiltración en función del estatus HPV. Los pacientes HPV+ contaron con una mejor supervivencia ajustada, si bien en este caso las diferencias no alcanzaron la significación estadística.

Uno de los elementos clásicos de mal pronóstico como es la presencia de una ruptura capsular en los vaciamientos cervicales¹⁷², pierde capacidad pronóstica en el caso de los pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+. Maxwell y cols¹⁷³ analizaron los resultados obtenidos en un grupo de 76 pacientes con carcinomas de orofaringe p16+ tratados con un vaciamiento cervical con presencia de adenopatías metastásicas (pN+), de los cuales 45 (59.2%)

presentaron adenopatías con ruptura capsular. Los autores no encontraron diferencias significativas en la supervivencia ajustada en función de la existencia de ganglios con ruptura, tal como muestra la siguiente figura.

FIGURA 67: Supervivencia ajustada en función de la existencia de ganglios con ruptura capsular



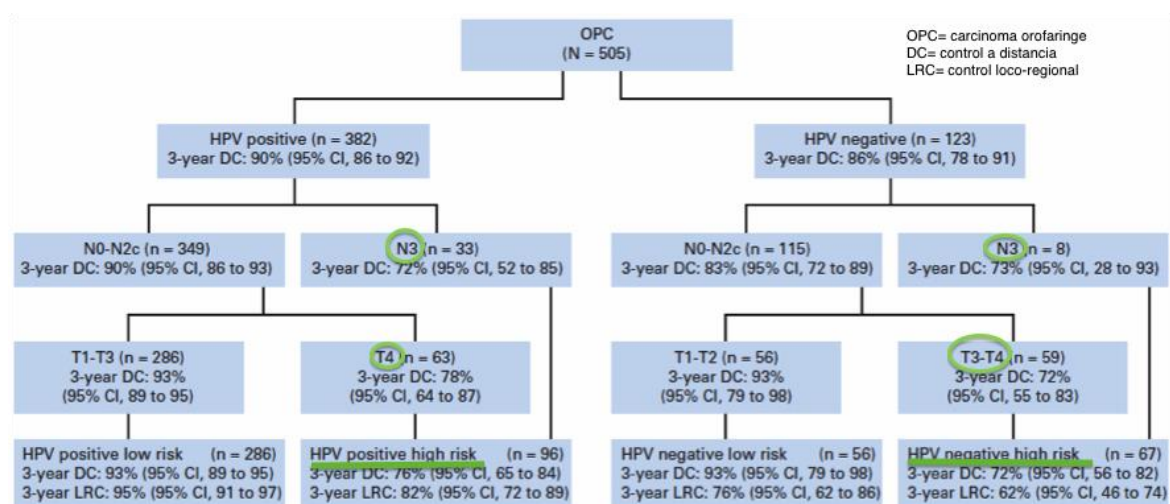
en carcinomas p16+ (tomada de Maxwell¹⁷³).

Por el contrario, para los pacientes con carcinomas de orofaringe p16- y los pacientes con carcinomas de cavidad oral, la existencia de adenopatía metastásicas con ruptura capsular se asoció a una disminución de la supervivencia.

Garden y cols¹⁷⁴ han presentado recientemente los resultados de control regional obtenidos en una serie amplia de pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ con afectación metastásica en el momento del diagnóstico y tratados con RT±quimioterapia en el University of Texas MD Anderson Cancer Center (USA) durante el periodo 2006-2012. En el momento del diagnóstico un 11% de los pacientes fueron clasificados como N1, un 82% como N2 (54% como N2b), y un 7% como N3. Se realizaron vaciamientos tras la radioterapia en 80 ocasiones (20%), apareciendo restos viables de tumor en 21 pacientes (26% del total de pacientes intervenidos). Un 8% de los pacientes desarrollaron una recidiva regional de la enfermedad, sin que esta recidiva se asociase a la

práctica de vaciamentos. La supervivencia a los 5 años libre de enfermedad regional para los pacientes en los que el tratamiento consiguió el control local de la enfermedad fue del 94%. La principal conclusión de los autores fue que una estrategia de tratamiento con radioterapia o quimio-radioterapia y vaciamiento cervical en función del grado de respuesta conseguido en pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ consiguió un elevado nivel de control de la enfermedad.

A pesar del favorable control loco-regional para los pacientes HPV+, la frecuencia de aparición de metástasis a distancia parece independiente del status HPV^{150,175}. De cara a plantear un desintensificación del tratamiento oncológico, sería conveniente el delimitar el grupo de pacientes HPV+ con un menor riesgo de aparición de metástasis a distancia. O'Sullivan y cols¹⁷⁶ realizaron un estudio en 505 pacientes con carcinomas de orofaringe tratados con radioterapia o quimioradioterapia, incluyendo 382 tumores HPV+ y 123 HPV-. Los pacientes HPV+ contaron con una mejor supervivencia y control loco-regional de la enfermedad. Sin embargo, la supervivencia libre de metástasis a distancia fue similar entre ambos grupos de pacientes (p=0.53). Los autores desarrollaron un análisis de partición recursiva para evaluar el riesgo de aparición de metástasis, considerando de forma independiente los pacientes en función del estatus HPV.



Análisis de partición recursiva que evalúa el riesgo de aparición de metástasis considerando de forma independiente los pacientes en función del estatus HPV (tomada de O'Sullivan¹⁷⁶).

Para los pacientes HPV+ el grupo de bajo riesgo lo constituyeron los pacientes T1-3N0-2 (supervivencia libre de metástasis a los 3 años 93%), y el de alto riesgo los pacientes T4 o N3 (supervivencia libre de metástasis a los 3 años 78%). En el caso de los pacientes HPV- el grupo de bajo riesgo incluyó a los pacientes T1-2N0-2 (supervivencia libre de metástasis a los 3 años 93%), y los de alto riesgo los T3-4 y N3 (supervivencia libre de metástasis a los 3 años 72%).

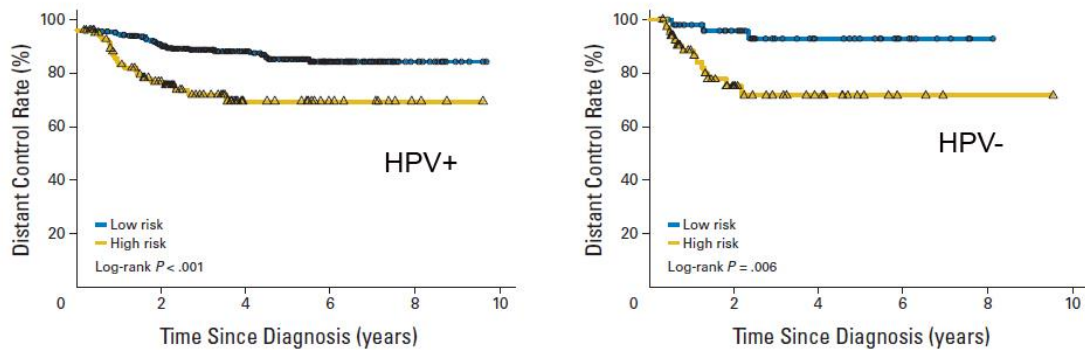


FIGURA 68: Supervivencia libre de metástasis en pacientes HPV+ según grupo de alto o bajo riesgo y en pacientes HPV- (tomada de O'Sullivan¹⁷⁶).

A partir de los resultados de dos ensayos clínicos en los que se analizaban diferentes fraccionamientos de radioterapia (RTOG-0129, RTOG-0522) en pacientes con carcinomas de orofaringe, Fakhry y cols¹⁷⁷ evaluaron la existencia de diferencias en el pronóstico de los pacientes que sufrieron una recidiva de la enfermedad en función del estatus HPV. Se analizaron un total de 181 pacientes con enfermedad recidivada, de los cuales 105 (58%) fueron p16+. Los pacientes p16 + eran más jóvenes, de raza blanca, con menor exposición al tabaco, y con tumores menos avanzados. El periodo promedio al fracaso no fue diferente en función del estatus HPV (8.2 meses en p16+ y 7.3 meses en p16-, p=0.67). La localización del fracaso fue loco-regional en 100 pacientes (55.2%), metástasis a distancia en 72 (39.8%) y tanto loco-regional como metastásica en 9 (5%). No existieron diferencias en la distribución de la localización de la recidiva en función de la p16. Tampoco aparecieron diferencias significativas en la proporción de pacientes que fueron considerados candidatos a cirugía de rescate e función de la p16 (27.6% para p16+ versus 26.3% para p16-, p=0.85).

La supervivencia tras la recidiva para los pacientes p16+ fue significativamente superior que la de los negativos ($p < 0.001$), tal como aparece en la siguiente figura.

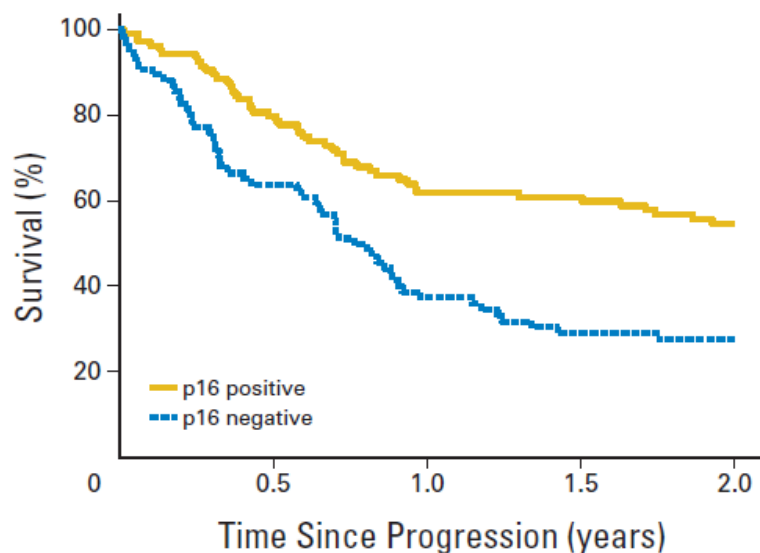


FIGURA 69: Supervivencia tras recidiva en pacientes con carcinomas de orofaringe en función de inmunohistoquímica p16+ y p16- (tomada de Fakhry¹⁷⁷).

La supervivencia global a los 2 años tras la progresión para los pacientes p16+ fue del 54.6% (IC 95%: 44.9-64.4%) y para los p16- del 27.6% (IC 95%: 17.3-37.9%).

El beneficio en supervivencia para los pacientes p16+ se observó tanto en el grupo de pacientes con recidiva loco-regional ($p < 0.001$) como con metástasis a distancia ($p = 0.04$), como se observa en las siguientes figuras.

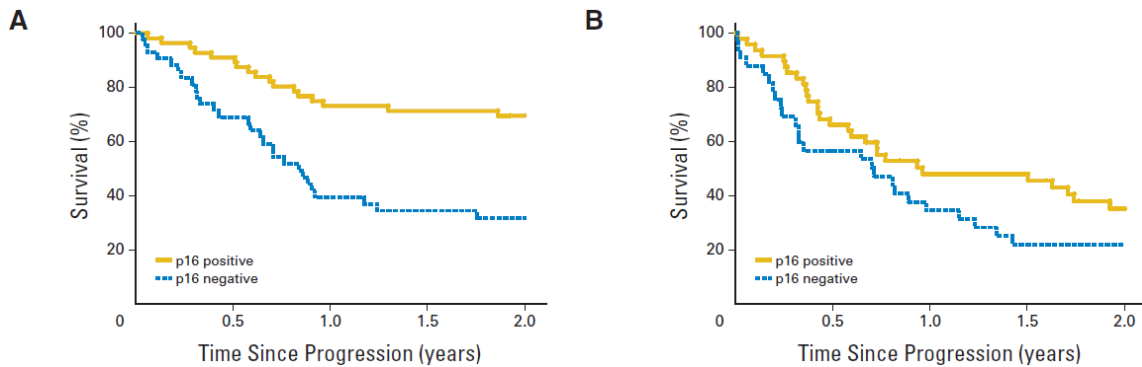


FIGURA 70: Curvas de supervivencia ajustadas en pacientes con recidiva loco-regional (A) y en pacientes con metástasis a distancia (B) en función a la positividad a la p16 (tomada de Fakhry¹⁷⁷).

En un estudio multivariante, las variables que se relacionaron de forma significativa con la supervivencia tras la progresión del tumor incluyeron el estatus p16, la extensión inicial del tumor, el tipo de recidiva (loco-regional versus metástasis a distancia), si el paciente fue considerado candidato a cirugía de rescate, y el tabaquismo. De acuerdo con los resultados de este estudio multivariante, en relación a los pacientes p16-, los pacientes p16+ tuvieron un hazard ratio de mortalidad de 0.57 (IC 95%: 0.39-0.84, p=0.005).

En otro estudio realizado en pacientes con tumores recurrentes o metastásicos candidatos a un tratamiento de quimioterapia en un contexto paliativo, Argiris y cols¹⁷⁸ también llegaron a la conclusión de que los pacientes con tumores HPV+ contaban con una mayor probabilidad de respuesta y mayor supervivencia. De un total de 64 pacientes evaluados, 12 (19%) contaron con inmunopositividad frente a p16. La probabilidad de respuesta tras el tratamiento con quimioterapia para los pacientes p16+ fue del 50%, frente al 19% para los p16- (p=0.057), con una mediana de supervivencia de 11.9 meses versus 6.7 meses respectivamente (p=0.027).

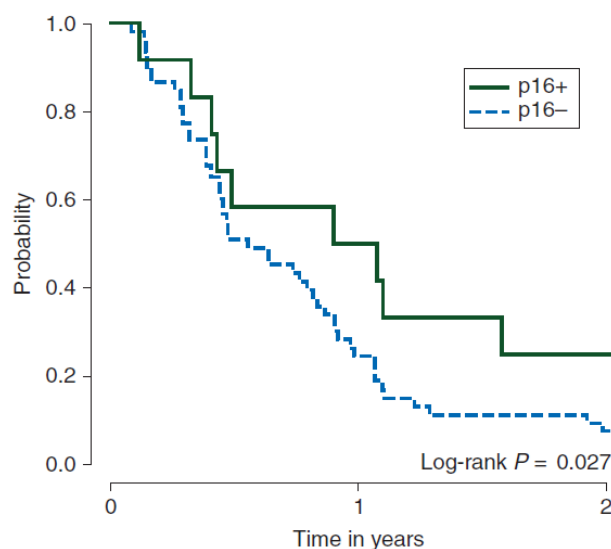


FIGURA 71: Probabilidad de respuesta al tratamiento quimioterápico en contexto de pacientes paliativos en función del estatus HPV (tomada de Argiris¹⁷⁸).

De acuerdo con el resultado de un estudio multivariante, la infección HPV o la inmunopositividad frente a p16 aparecieron como variables con capacidad pronóstica significativa favoreciendo la supervivencia de estos pacientes.

Vainshtein y cols¹⁷⁹ analizaron la correspondencia existente entre el estatus HPV del tumor inicial y la recidiva loco-regional o a distancia en una cohorte de 37 casos de carcinomas de orofaringe recidivados, de los cuales 32 (86.5%) fueron HPV+. Los autores analizaron los especímenes de la biopsia inicial y de la recidiva (loco-regional en 16 pacientes y a distancia en 21) mediante hibridación e inmunohistoquímica de la p16. La concordancia entre el tumor inicial y la recidiva fue del 97%. Sólo un paciente HPV+ con antecedente de tabaquismo importante contó con la aparición de un tumor pulmonar único HPV- a los 3.6 años del tratamiento del tumor inicial, pudiendo tratarse de una segunda neoplasia metacrónica, con lo que la concordancia alcanzaría el 100%.

Además de los estudios que evalúan la capacidad pronóstica de la infección HPV en los pacientes con carcinomas de orofaringe, son diversos los meta-análisis que han evaluado dicha capacidad en pacientes con CECC en general, o de los pacientes con carcinomas de orofaringe de forma más específica.

Discusión

En un primer meta-análisis publicado en 2007 por Ragin y cols¹⁸⁰, los pacientes con tumores HPV+ contaron con un beneficio en la supervivencia y el control de la enfermedad. Los pacientes HPV+ tuvieron un menor riesgo de mortalidad (HR: 0.85, IC 95% 0.7-1.0) y de recidiva (HR:0.62, IC 89,5%.0.5-0.8) que los pacientes HPV-.

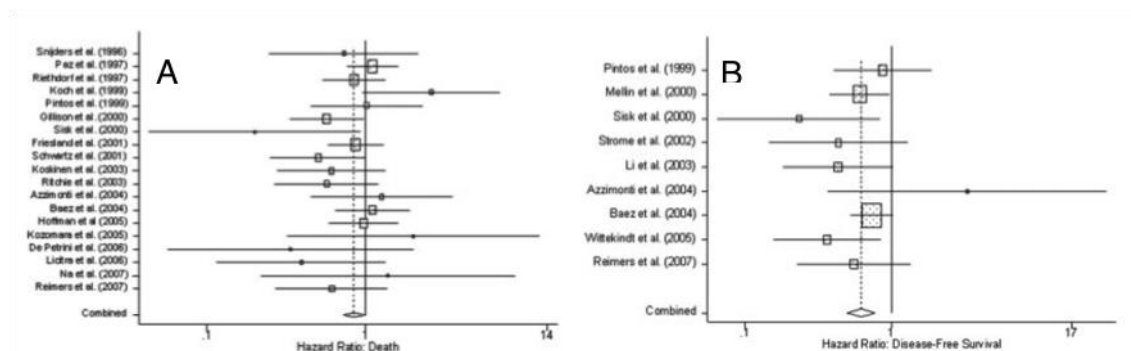


FIGURA 72: Representación con diagrama de bosque donde recoge la menor riesgo de mortalidad (A) y de recidiva (B) en pacientes HPV+ (tomada de Ragin¹⁸⁰).

Este beneficio en la supervivencia y el control de la enfermedad se consiguió a expensas de los pacientes con tumores localizados en la orofaringe. Los pacientes HPV+ contaron con una reducción del 28% de su mortalidad (HR:0.72, IC 95% 0.5-1.0), en tanto que no aparecieron diferencias en función del estatus HPV para los pacientes con tumores localizados fuera de la orofaringe.

En un estudio realizado en el año 2010, Dayyani y cols¹⁸¹ evaluaron en primer lugar la prevalencia de tumores HPV+ en una revisión de 34 estudios publicados, agrupando datos de 5,681 pacientes. La prevalencia de HPV entre los pacientes con CECC fue del 21.95%, con un predominio del HPV-16, que representó el 86.7%, correspondiendo el resto de tumores HPV+ de forma preferente a los genotipos 18 y 33. El análisis de supervivencia se realizó a partir de 7 estudios, pudiendo comprobarse un incremento significativo en la supervivencia para los pacientes HPV+, con un hazard ratio de 0.42 (IC 95%:0.27-0.56, $p < 0.0001$).

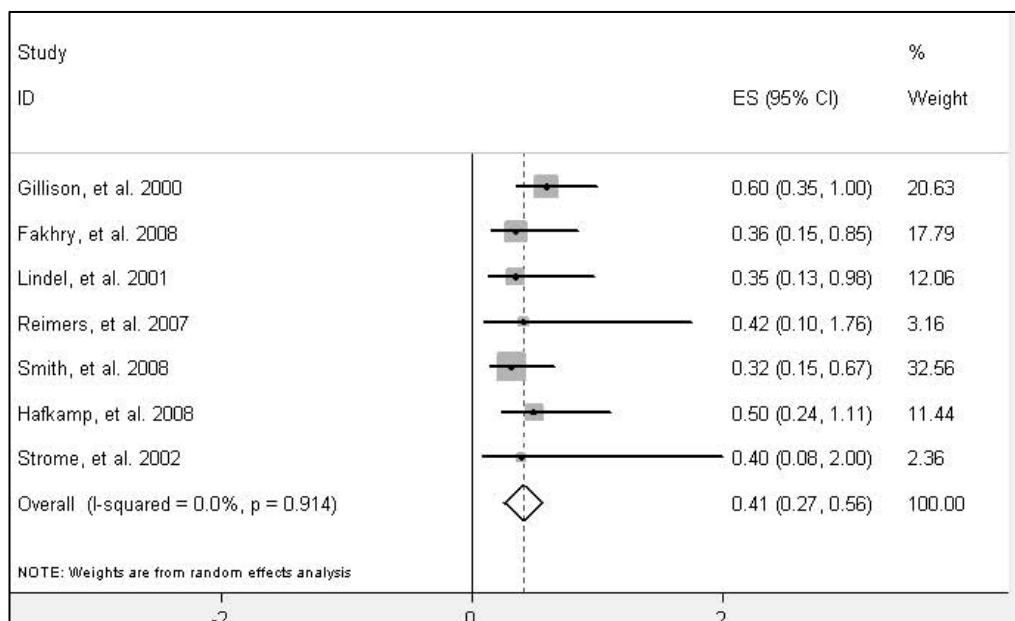


FIGURA 73: Representación con diagrama de bosque de la supervivencia a partir de 7 estudios donde se demuestra aumento de la supervivencia en pacientes HPV+ en CECC (tomada de Dayyani¹⁸¹)

Este beneficio en supervivencia fue aún más pronunciado al considerar de forma aislada a los pacientes con carcinomas de orofaringe, con un HR=0.40 (IC 95%:0.18-0.61, p<0.0001).

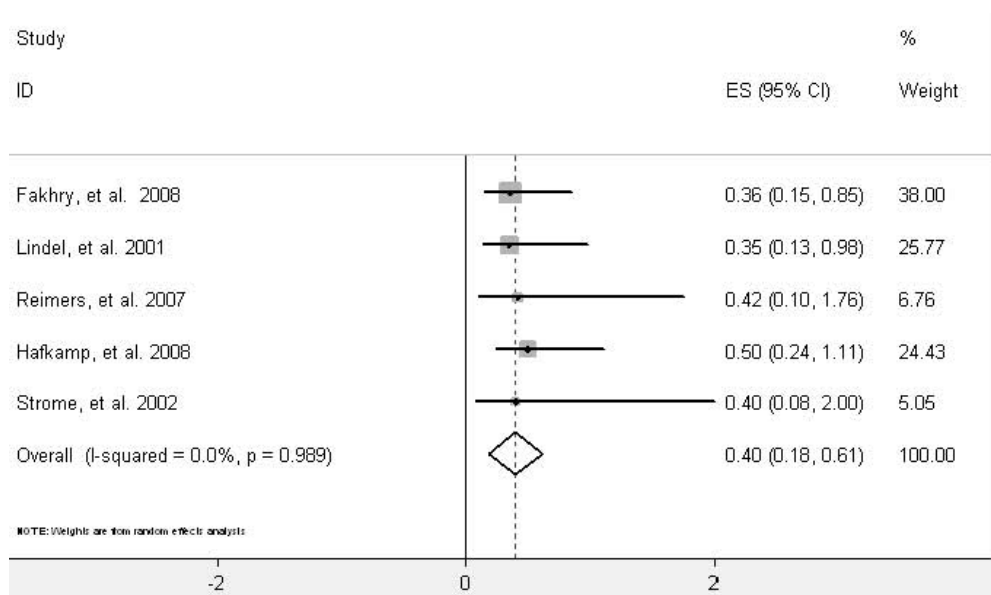


FIGURA 74: Representación con diagrama de bosque de la supervivencia a partir de 5 estudios donde se demuestra aumento de la supervivencia en pacientes HPV+ en COF (tomada de Dayyani¹⁸¹).

Discusión

Además, pudo constatarse como los pacientes HPV+ contaron con un mejor control local tras el tratamiento con radioterapia (OR=4.07, IC 95%:1.48-11.18, p=0.006) o quimioradioterapia (OR=2.87, IC 95%:1.29-6.41, p=0.01).

En otro meta-análisis, O'Rorkey cols¹⁸² ampliaron la muestra de estudios analizados, incluyendo un total de 42 publicaciones realizadas a partir de pacientes con CECC tratados en USA-Canada (19 estudios), Europa (14 estudios) y Asia o Australia (9 estudios). Considerando la supervivencia global, el hazard ratio acumulado comparando los pacientes HPV+ con los negativos fue de 0.46 (IC 95%:0.37-0.57), con una hazard ratio de 0.28 (IC 95%: 0.19-0.4) si se considera la supervivencia ajustada.

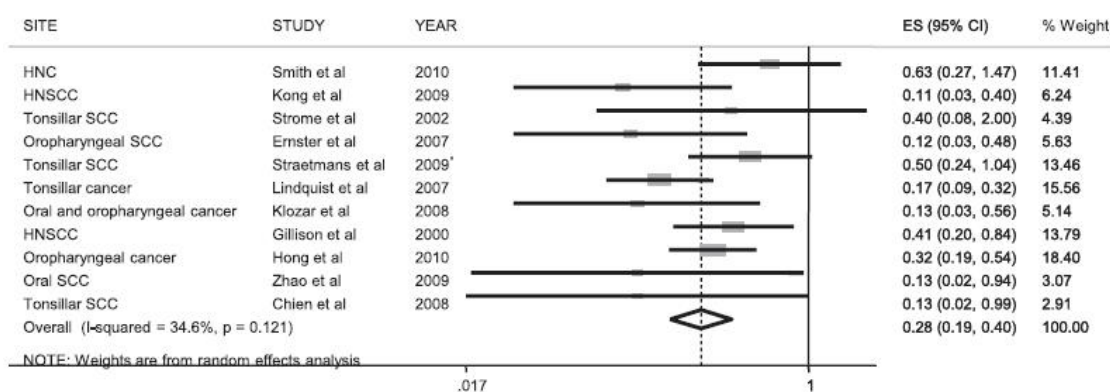


FIGURA 75: Representación con diagrama de bosque de la supervivencia donde se demuestra aumento de la supervivencia global en pacientes HPV+ (tomada de O'Rorkey¹⁸²).

Finalmente, en un meta-análisis de reciente publicación realizado a partir de 37 series de pacientes con carcinomas de orofaringe tratados con radioterapia; Petrelli y cols¹⁸³ determinaron que los pacientes con tumores HPV+ contaron con un incremento significativo en la supervivencia global, con un valor de hazard ratio de 0.33 (IC 95%: 0.27–0.40; p<0.00001) si se consideran la totalidad de tratamientos incluyendo cirugía y radioterapia, y un hazard ratio de 0.39; (p<0.00001) en caso de considerar tan sólo aquellas series de pacientes tratados de forma exclusiva con radioterapia o quimioradioterapia.

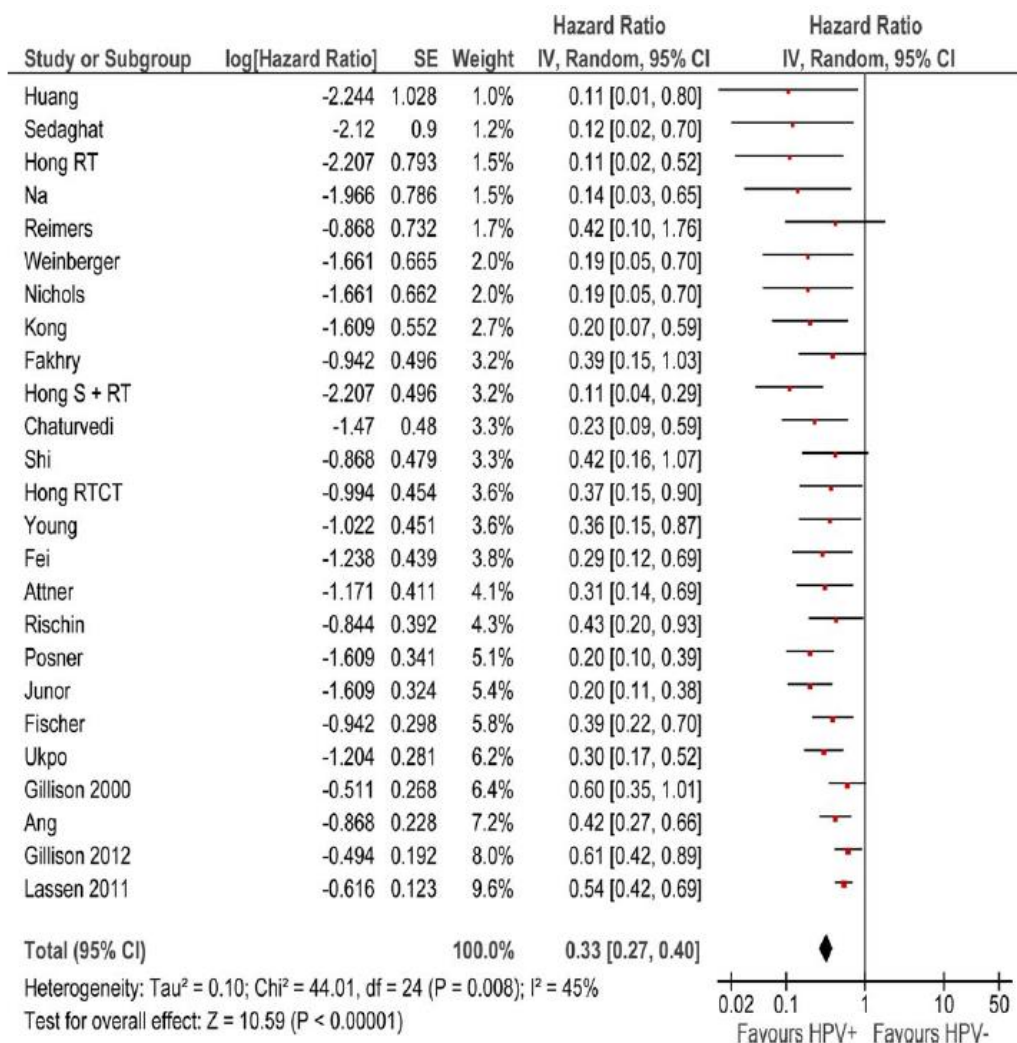


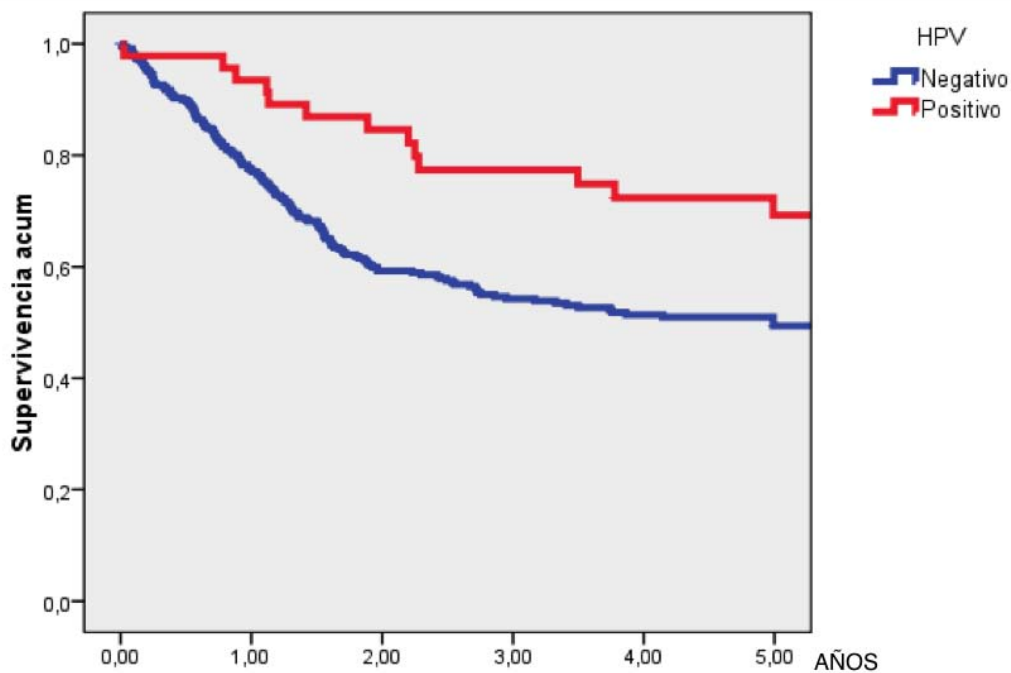
FIGURA 76: Representación con diagrama de bosque de la supervivencia donde se demuestra aumento de la supervivencia global en pacientes HPV+ (tomada de Petrelli¹⁸³).

Además, los pacientes HPV+ contaron con una mejor supervivencia ajustada (HR 0.39, IC 95%:0.3-0.59, p<0.00001), y mejor supervivencia libre de enfermedad (HR 0.31, IC 95%:0.24-0.40, p<0.00001). Por el contrario, no aparecieron diferencias significativas en cuanto al riesgo de aparición de metástasis a distancia en función del estatus HPV (HR 1.16, p=0.56).

Resultados del estudio HSP.

Un elemento a considerar a la hora de analizar los resultados oncológicos es que, dada la naturaleza retrospectiva de nuestro estudio, para la mayoría de las ocasiones el estatus HPV de los tumores fue desconocido en el momento de llevarse a cabo el diagnóstico oncológico, y que, en consecuencia, no existían diferencias en cuanto al tipo de tratamiento propuesto en función de la existencia de infección HPV a nivel orofaríngeo.

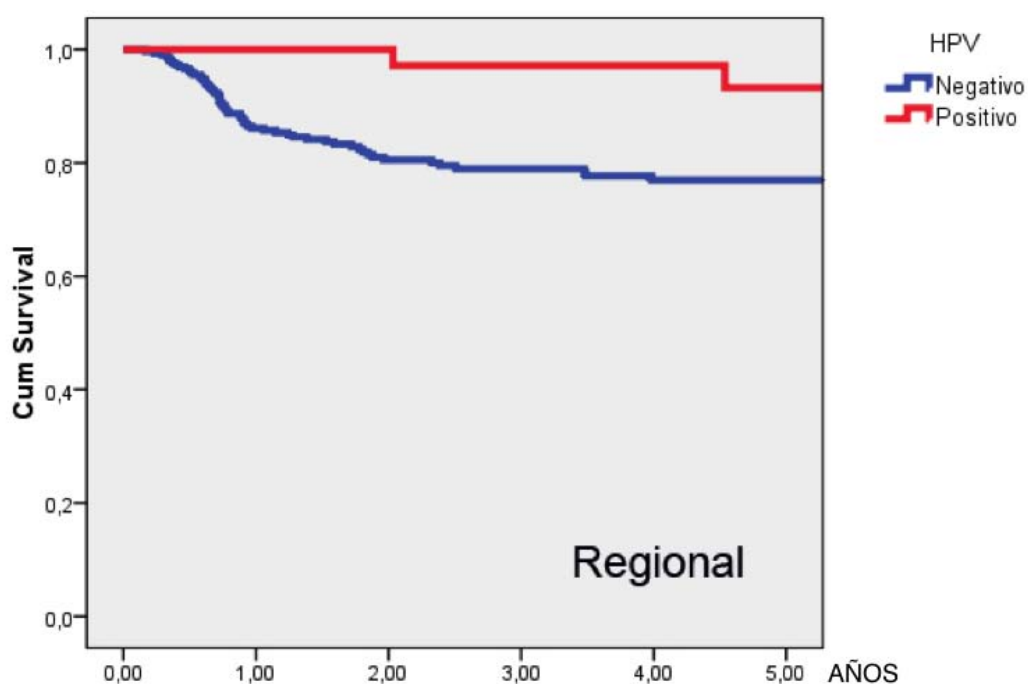
Al igual que la gran mayoría de estudios que han evaluado la influencia del estatus HPV en la supervivencia de los pacientes con carcinomas de orofaringe, los resultados de nuestro estudio encontraron que los pacientes con tumores HPV+, a pesar de presentarse con tumores con estadios más avanzados, tuvieron una mejor supervivencia que los pacientes con tumores HPV-.



Esta mejoría en la supervivencia se produjo a expensas de los pacientes con tumores con estadios avanzados (estadios III-IV) y preferentemente para aquellos pacientes que recibieron un tratamiento no quirúrgico. Ni en los pacientes con tumores iniciales (estadios I-II) ni en aquellos pacientes que recibieron un tratamiento con cirugía, complementada o no con radioterapia

postoperatoria, el estatus HPV apareció como una variable con capacidad pronóstica en relación con la supervivencia.

El estudio pormenorizado en relación con el control de la enfermedad demostró que en los pacientes HPV+ el tratamiento realizado consiguió un mejor control local y regional de la enfermedad, en tanto que no modificó de forma significativa el riesgo de aparición de metástasis a distancia. Destaca el hecho de que los pacientes HPV+, a pesar de contar con una mayor carga ganglionar de la enfermedad, consiguieron una supervivencia libre de recidiva regional significativamente mejor que la correspondiente a los pacientes HPV- ($p=0.009$), y que estas diferencias en el control regional de la enfermedad son en gran medida las que justifican las diferencias en la supervivencia observadas en función de la afectación HPV.



Al igual que lo comunicado por otros autores, para los pacientes HPV+ la afectación regional, que habitualmente aparece como uno de los factores pronósticos con una mayor relevancia para los pacientes con CECC, perdió su capacidad pronóstica.

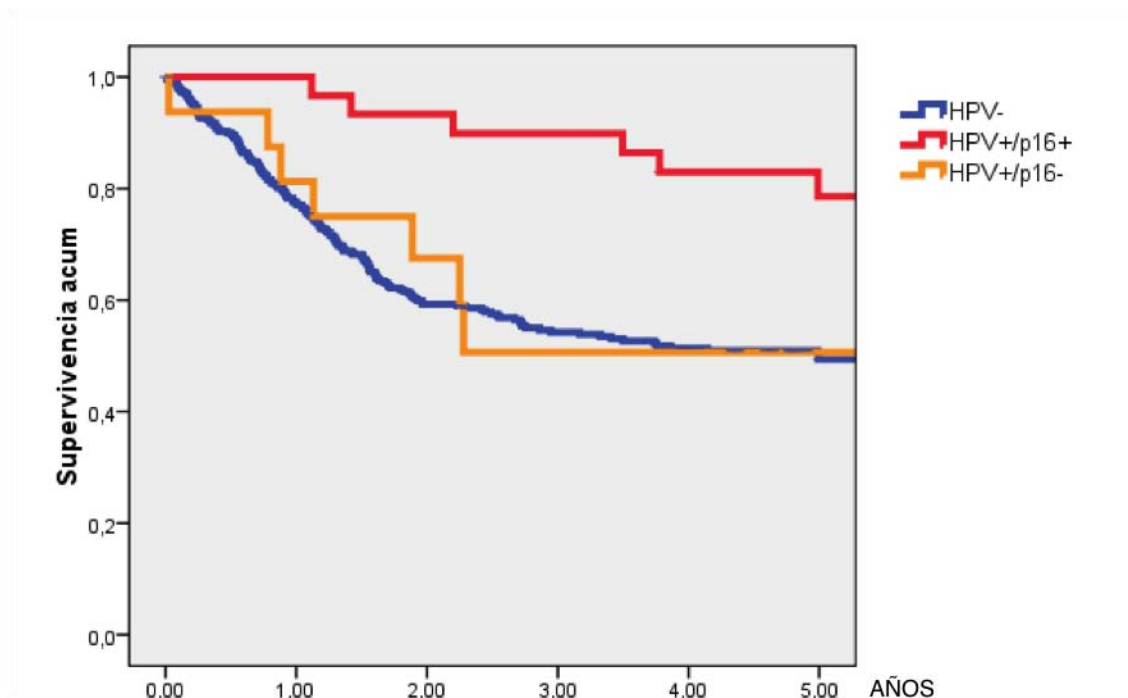
Una evidencia de que el tratamiento cuenta con una mayor eficacia en el control de la enfermedad en los pacientes con tumores HPV+ aparece en los resultados anatomopatológicos obtenidos en los vaciamientos cervicales realizados tras la finalización de la radioterapia o quimiorradioterapia debido a la existencia de sospecha clínica o radiológica de persistencia de la enfermedad a nivel cervical. Sólo aparecieron restos tumorales viables en un 14.3% de los vaciamientos cervicales realizados en pacientes con tumores HPV+ (1/7), en tanto que este porcentaje aumentó hasta el 41.2% para los pacientes con tumores HPV- (14/34).

Existen evidencias que señalan que la relación del HPV con el pronóstico de la enfermedad no dependía exclusivamente de la presencia del virus, si no de que el proceso carcinogénico que condujo a la aparición del tumor fuese como consecuencia de la actividad del HPV. En este sentido, se han descrito diferencias significativas en el pronóstico de los pacientes con tumores HPV+ en función del nivel de expresión de la p16. Los pacientes HPV+/p16+ contarían con tumores promovidos por la actividad viral (clase III), en tanto que en los tumores HPV+/p16- representarían la existencia de una infección viral coincidente con un tumor promovido por procesos carcinogénicos no relacionados con el HPV, y contarían con un pronóstico similar a los tumores HPV-⁹⁶.

		p16 Status	
		Nonoverexpressing	Overexpressing
HPV-16 DNA	Absent	Class I	—
	Present	Class II	Class III

Los resultados obtenidos a partir de nuestros pacientes confirman esta hipótesis. Un tercio de nuestros pacientes HPV+ mostraron negatividad en la valoración inmunohistoquímica de la p16, cuestionando el papel carcinogénico jugado por

el virus en estos pacientes HPV+/p16-. Los pacientes con tumores HPV+/p16+ contaron con un pronóstico significativamente mejor al de los pacientes HPV+/p16-, que tuvieron una supervivencia similar a la de los pacientes HPV-.



De acuerdo con los resultados de un análisis multivariante en el que se incluyeron como variables independientes la categoría de extensión local y regional de la enfermedad, la sublocalización del tumor, y el estatus HPV/p16, y como variable independiente la supervivencia ajustada, considerando como categoría de referencia a los pacientes HPV+/p16+, los pacientes HPV+/p16- contarían con un riesgo de fallecer como consecuencia de la evolución del carcinoma de orofaringe 2.5 veces superior (IC 95%: 0.8,7.5, P=0.102), y los pacientes HPV- 3.2 veces superior (IC 95%: 1.4-7.3, P=0.006). Las otras variables que se relacionaron de forma significativa con la supervivencia fueron la extensión local avanzada del tumor y su localización a nivel de la pared posterior de la orofaringe.

Finalmente, el estándar de excelencia en relación con el papel carcinogénico jugado por el HPV en un tumor vendría dado por demostrar la actividad biológica

del virus. A partir de una determinación de la expresión de los genes del HPV relacionados con la promoción tumoral E6/E7 es posible verificar su actividad como promotor del proceso oncológico.

Un estudio realizado en 30 de los tumores HPV+/p16+ de nuestra serie demostró un elevado grado de coincidencia entre la expresión del gen que codifica E6 en este grupo de pacientes (29/30 pacientes, 96.7% de coincidencia). Para los pacientes HPV+/p16- estudiados, la expresión del E6 apareció positiva en la mitad de las ocasiones (7/14, 50% de coincidencia). En estos pacientes HPV+/E6mRNA+, los niveles de expresión de la p16 fueron superiores que para los HPV+/E6mRNA-, pero sin que el grado de positividad a la p16 pudiese catalogarlos como p16+. Es muy posible que en estos pacientes HPV+/p16-/E6mRNA+ el HPV se encuentre implicado en el proceso carcinogénico, y que se trate de un falso negativo de la p16. Serán necesarios estudios más amplios para poder cuantificar el porcentaje de ocasiones en el que se produce esta discrepancia entre las diferentes técnicas utilizadas para valorar la presencia de infección HPV y su papel en la promoción de tumores a nivel de las mucosas de la orofaringe.

Influencia del tabaco en pacientes HPV+

Revisión de la literatura.

De acuerdo con los resultados obtenidos por Ang y cols¹⁵⁰, el comportamiento biológico correspondiente a los pacientes HPV+ podría verse modificado por la acción del tabaco. Los estudios que relacionan la influencia del tabaco en los resultados obtenidos tras el tratamiento en pacientes HPV+ han mostrado resultados contradictorios.

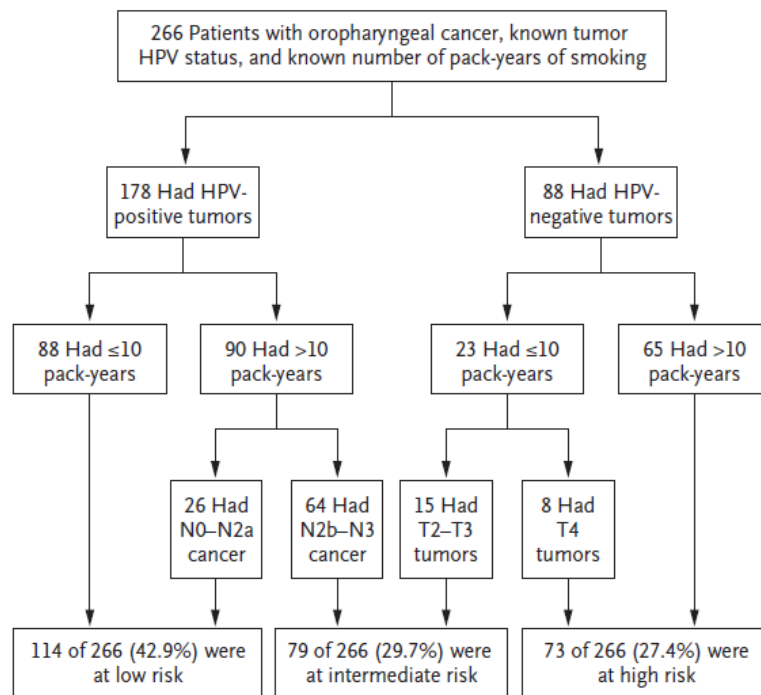
Dos ensayos clínicos evaluados por Maxwell y cols¹⁸⁴ mostraron que el estatus HPV no necesariamente confiere una mejora significativa en el pronóstico para los pacientes fumadores. Los autores analizaron un total de 124 pacientes con carcinomas de orofaringe con estadios avanzados (III-IV) tratados entre 1999-2007 de acuerdo con dos protocolos de la Universidad de Michigan (USA) que incluían quimioterapia de inducción, cirugía o quimio-radioterapia. Un 82% de los pacientes fueron HPV+ de acuerdo con un estudio con PCR. De éstos, un 32.3% no contaron con el antecedente de tabaquismo, 45% eran exfumadores, y 22.6% fumadores activos. La totalidad de los pacientes HPV- contaron con el antecedente de tabaquismo. Para los pacientes HPV+, el porcentaje de recidivas entre los pacientes no fumadores fue del 6.1%, entre los exfumadores del 19.6%, y entre los fumadores activos del 34.8%. En relación a los pacientes no fumadores, el hazard ratio de recidiva para los pacientes fumadores activos fue de 5.2 (IC 95%: 1.1-24.4, p=0.038) y para los exfumadores de 2.9 (IC 95%: 0.6-13.6, p=0.18).

Gillison y cols¹⁸⁵ analizaron 190 pacientes con carcinomas de orofaringe incluidos en dos ensayos clínicos realizados por la RTOG (USA) durante 1991-1997, utilizando como marcador del estatus HPV la inmunopositividad frente a la p16. Un 39.5% de los pacientes fueron catalogados como HPV+, contando éstos con un menor consumo de tabaco. Los resultados de un estudio multivariante mostraron que, tras el ajuste por p16 y otros factores de riesgo, tanto la supervivencia libre de progresión como la observada empeoraban de forma significativa con el consumo de tabaco. El hazard ratio de muerte se

incrementaba aproximadamente un 1% por cada paquete/año y un 2% por cada año de consumo ($p=0.002$ y $p<0.001$, respectivamente).

De acuerdo estos resultados, esta serie de autores postulan que el modelo carcinogénico correspondiente a los HPV+ en los pacientes fumadores diferiría del de los no fumadores.

Ang y cols¹⁵⁰ analizaron 323 pacientes con carcinomas de orofaringe, evaluando diferentes variables relacionadas con la supervivencia. Un estudio de partición recursiva mostró que el estatus HPV aparecía como el factor pronóstico más determinante para la supervivencia global, seguido por el consumo de tabaco y la afectación ganglionar para los pacientes HPV+, y el consumo de tabaco y la extensión local para los HPV-, obteniendo un árbol de clasificación con 6 nodos terminales que fueron agrupados en 3 categorías.



De acuerdo con esta clasificación, los autores definieron 3 grupos con pronóstico diferenciado. Los pacientes HPV+ no fumadores, o fumadores con afectación ganglionar limitada integraron el grupo de bajo riesgo. Los pacientes HPV+ fumadores y con afectación ganglionar extensa, o HPV- no fumadores y con tumores limitados (T2-3) contaron con un riesgo intermedio. Finalmente, los

pacientes HPV- no fumadores con tumores localmente avanzados (T4) o HPV- fumadores constituyeron el grupo de riesgo elevado.

<i>Grupo de bajo riesgo</i>	HPV+ no fumadores fumadores con afectación ganglionar limitada
<i>Grupo de riesgo intermedio</i>	HPV+ fumadores y con afectación ganglionar extensa HPV- no fumadores y con tumores limitados (T2-3)
<i>Grupo de alto riesgo</i>	HPV- no fumadores con tumores localmente avanzados (T4) HPV- fumadores

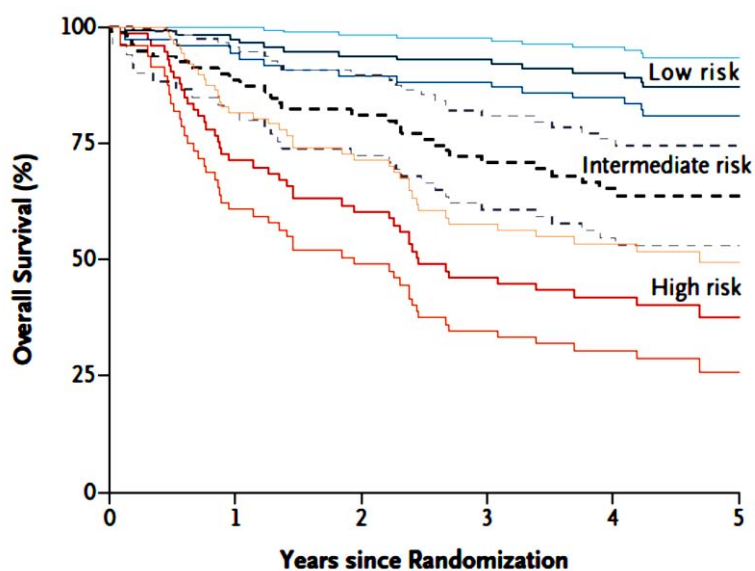


FIGURA 77: Supervivencia ajustada en función de los grupos de riesgo propuestos por Ang¹⁵⁰.

Sin embargo, estudios desarrollados por otros autores llegan a la conclusión de que el tabaco no modifica de forma específica en pronóstico de la enfermedad en los pacientes HPV+ en relación a los HPV-^{186,187}.

Hafkamp y cols¹⁸⁸ analizaron 81 pacientes con carcinomas de amígdala mediante hibridación fluorescente in situ (FISH) e inmunohistoquímica de la p16. Un 41% de los tumores (n=33) aparecieron HPV+ en el estudio FISH, con una imagen sugestiva de integración en el genoma celular. La frecuencia en el uso de tabaco y alcohol fue significativamente inferior en el grupo de pacientes HPV+ (p=0.002 y p=0.011, respectivamente). El control de la enfermedad y la supervivencia tanto observada como ajustada fueron significativamente inferiores para los pacientes HPV-. La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes HPV+ fue del 55%, en tanto que para los HPV- descendió al 29% (p=0.023). De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, si bien el estatus HPV contó con una tendencia como factor pronóstico (HR 2.00, IC 95%: 0.9-4.2, p=0.08), la variable que se relacionó de forma más significativa con la supervivencia fue el antecedente de uso de tabaco (HR 5.53, IC 95%:1.3-23.6, p=0.02).

Para los pacientes fumadores, el estatus HPV perdió gran parte de su capacidad pronóstica, tal como muestra la siguiente figura.

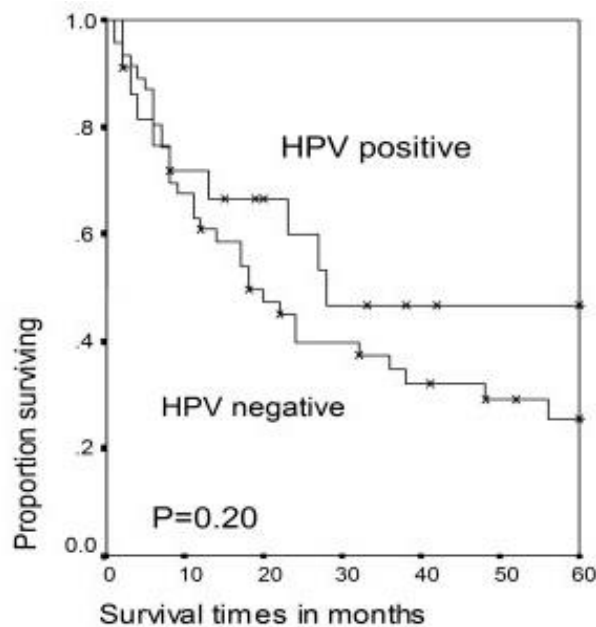
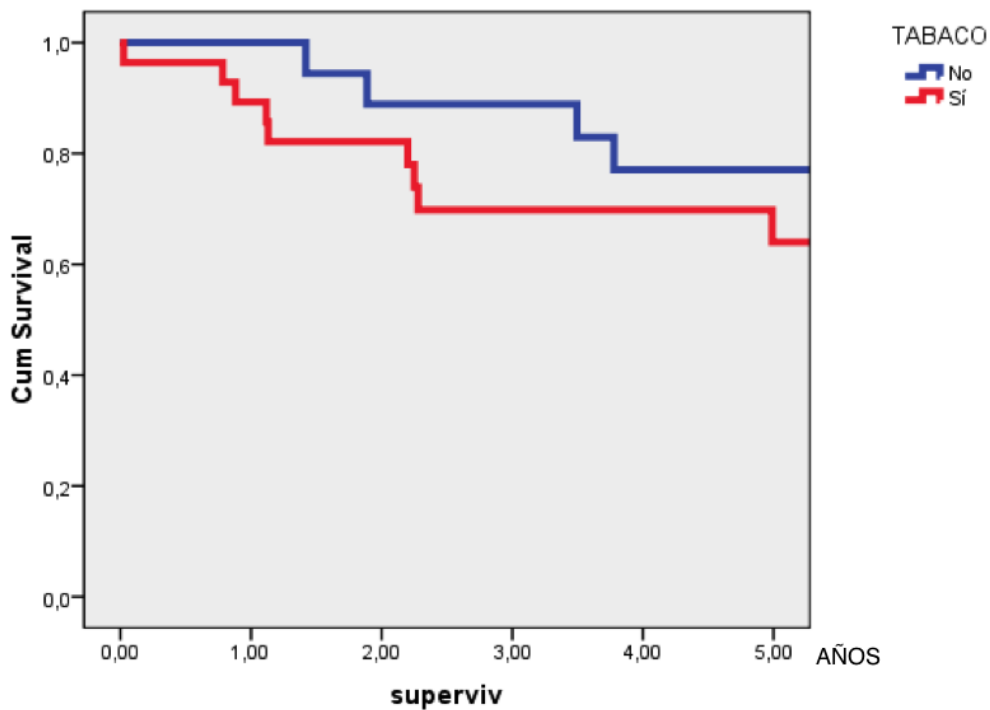


FIGURA 78: Supervivencia ajustada en pacientes con COF fumadores, no hay diferencias significativas en función de la positividad al HPV (tomada de Hafkamp¹⁸⁸).

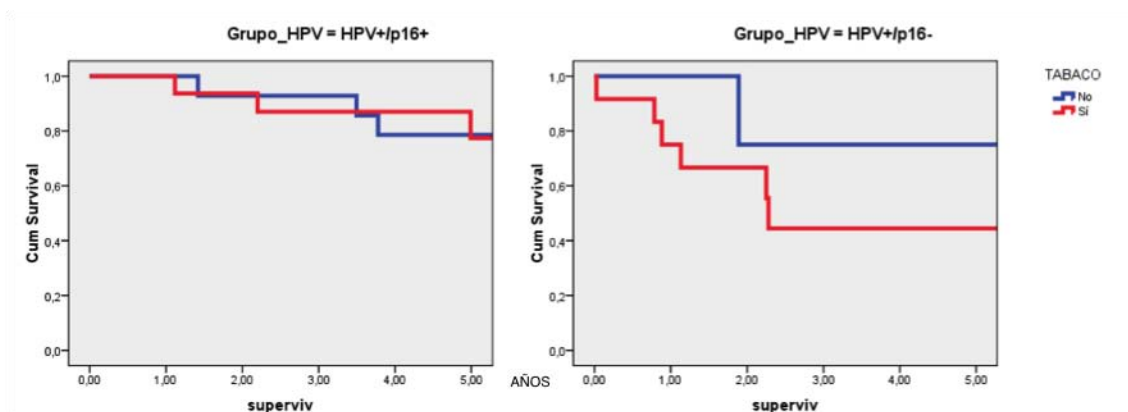
Hong y cols¹⁸⁹ diseñaron un estudio en el que pretendían evaluar de forma específica la relación entre el consumo de tabaco y el pronóstico en función del estatus HPV. Los autores analizaron 411 pacientes con carcinomas de amígdala tratados durante el periodo 1987-2006 en Australia. Se consideraron como HPV+ los pacientes con PCR positiva y una sobre-expresión de p16. Un 45.9% de los pacientes resultaron HPV+, con un perfil epidemiológico típico en esta población: menor edad media, menor categoría de extensión local y mayor de regional, y mayor grado histológico. El porcentaje de pacientes no fumadores / exfumadores / fumadores activos para los pacientes HPV+ fue del 28.6% / 41.1% / 30.3%, en tanto que para los HPV- fue del 4.1% / 29.8% / 66.1% (p=0.0001). De acuerdo con los resultados, el tabaquismo contó con capacidad pronóstica independiente en relación con la supervivencia observada, no modificando de forma significativa la supervivencia ajustada ni el control loco-regional de la enfermedad. No aparecieron evidencias que señalasen que la capacidad pronóstica atribuible al tabaco se viera modificada por el estatus HPV.

Resultados del estudio HSP.

Tal como señalamos anteriormente, los resultados obtenidos al analizar nuestro grupo de pacientes indican que los pacientes con tumores HPV+ contaron con una menor frecuencia en el antecedente de tabaquismo. Al analizar la supervivencia de los pacientes HPV+, pudimos observar que no aparecieron diferencias significativas en función del antecedente de tabaquismo, tal como muestra la siguiente curva de supervivencia ($p=0.342$).



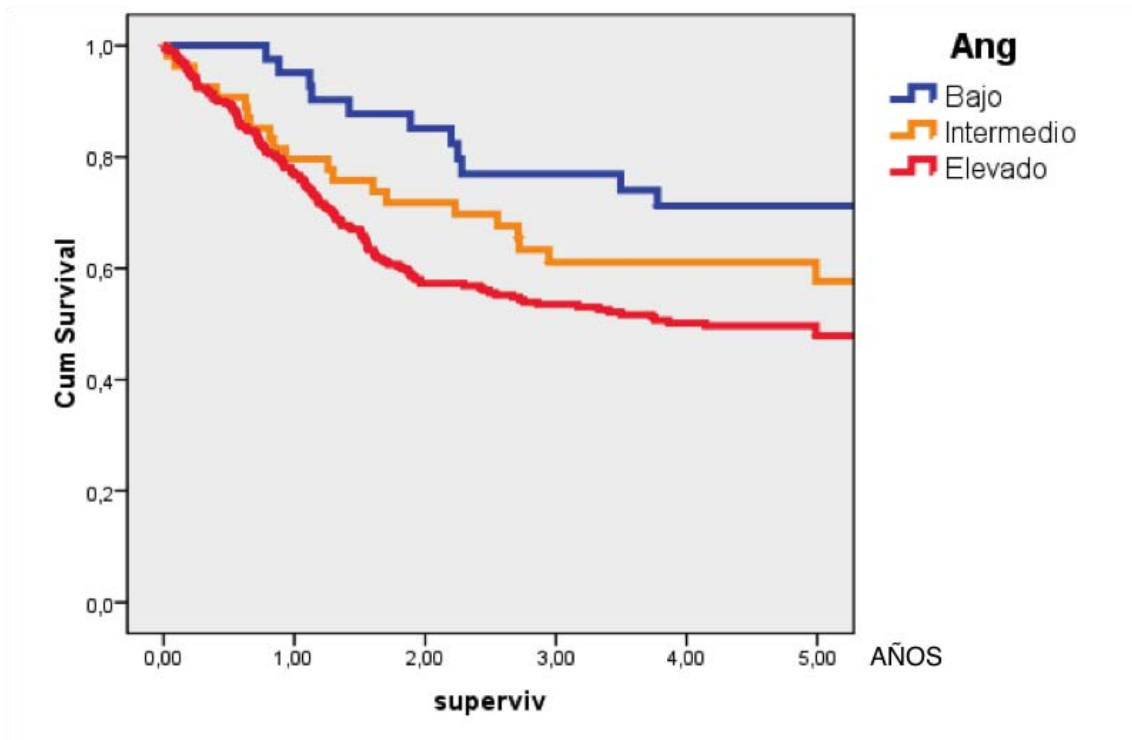
Al analizar los pacientes HPV+ considerando también la expresión de la p16, se pudo observar como el antecedente de tabaquismo no influyó en el resultado para los pacientes HPV+/p16+ ($p=0.959$), en tanto que para los HPV+/p16- apareció una tendencia hacia un peor pronóstico para los pacientes con antecedente de tabaquismo ($p=0.382$).



Se llevó a cabo una reclasificación de nuestros pacientes de acuerdo con los criterios establecidos por Ang y cols¹⁵⁰. Un 10.6% de los pacientes se incluyó en la categoría de bajo riesgo, un 14% en la de riesgo intermedio, y un 75.4% en la de riesgo elevado.

<i>Grupo de bajo riesgo</i>	<p>HPV+ no fumadores</p> <p>fumadores con afectación ganglionar limitada</p>	10.6%
<i>Grupo de riesgo intermedio</i>	<p>HPV+ fumadores y con afectación ganglionar extensa</p> <p>HPV- no fumadores y con tumores limitados (T2-3)</p>	14%
<i>Grupo de alto riesgo</i>	<p>HPV- no fumadores con tumores localmente avanzados (T4)</p> <p>HPV- fumadores</p>	75,4%

Existieron diferencias significativas en la supervivencia ajustada en función de la categoría de riesgo ($p=0.011$), si bien no fueron tan marcadas como las obtenidas en el estudio original de Ang y cols. La siguiente figura muestra la supervivencia ajustada para los pacientes incluidos en el estudio en función de la categoría de riesgo.



Los datos obtenidos en nuestro estudio son compatibles con el concepto expresado por algunos autores en el sentido que el antecedente de tabaquismo cuenta con un escaso poder pronóstico en los pacientes con tumores HPV+.

Relación del HPV con la aparición de segundas neoplasias

Revisión de la literatura.

Los pacientes con CECC cuentan con un riesgo elevado de aparición de segundas neoplasias, localizadas de forma preferente a nivel de las vías aerodigestivas, incluyendo el pulmón, el esófago y de nuevo cabeza y cuello¹⁹⁰. En general, estas segundas neoplasias aparecen en el contexto establecido por Slaughter y cols¹⁹¹ de cancerificación de campo, según el cual los carcinógenos ambientales como el tabaco y el alcohol, que promovieron la aparición del tumor índice de cabeza y cuello, habrían inducido la aparición de alteraciones a nivel del resto de mucosas del tracto aerodigestivo con capacidad de dar lugar a la formación de nuevos tumores.

Los pacientes con tumores HPV+ cuentan con una menor carga en el consumo de tabaco y alcohol, por lo que sería menos probable la aparición de segundas neoplasias promovidas en campos de cancerización por estas sustancias. Sin embargo, estos mismos pacientes infectados por HPV podrían hipotéticamente contar con una elevación en el riesgo de aparición de nuevos tumores relacionados con el HPV, ya sea a nivel genital o de nuevo en cabeza y cuello.

Joseph y cols¹⁹² determinaron si en pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ con una segunda neoplasia amigdalal, ésta contaba se encontraba infectada por HPV y cuál era el genotipo responsable. A partir de un estudio de los 135 pacientes con carcinomas amigdalal tratados entre 1999-2006 en el Johns Hopkins Hospital (USA), se identificaron 6 pacientes con una segunda neoplasia en la amígdala, disponiéndose de material para estudio en 4 ocasiones. En tres casos se trataba de tumores sincrónicos y en uno un tumor metacrónico, todos ellos tumores iniciales (T1 o carcinoma in situ). La secuenciación del genotipo viral demostró que en los 4 casos la infección de ambos tumores correspondía al mismo HPV-16, sugiriendo una infección viral común como causante de los dos tumores.

Si bien, tal como queda demostrado, es posible el desarrollo de tumores múltiples en relación con la infección HPV, queda por determinar si esta infección supone un incremento en el riesgo de aparición de segundas neoplasias tal como sucede con el modelo clásico de carcinogénesis en los pacientes con CECC.

Morris y cols¹⁹³ llevaron a cabo un extenso análisis del riesgo de aparición de segundas neoplasias en pacientes con un tumor índice de cabeza y cuello a partir de los datos de la base SEER (1975-2006). Se incluyeron en el estudio pacientes con un tumor primario localizado en cavidad oral, oro-hipofaringe y laringe. Se identificaron un total de 75,087 pacientes con un tumor índice de cabeza y cuello. Pudo observarse como el riesgo de aparición de una segunda neoplasia fue más elevado para los pacientes con tumores localizados en la hipofaringe que para los que contaron con tumores localizados en la cavidad oral o la laringe, con una cierta tendencia hacia el incremento en los valores de riesgo a lo largo del periodo de estudio. Por el contrario, para los pacientes con tumores

de localización orofaríngea se produjo una tendencia hacia la declinación en el riesgo de aparición de segundas neoplasias. De acuerdo con los resultados, el riesgo de aparición de segundas neoplasia para los pacientes con carcinomas de orofaringe antes de 1990 era el segundo más elevado tras el correspondiente al de los pacientes con carcinomas de hipofaringe, pero a partir de entonces el riesgo de aparición de segundas neoplasias en este grupo de pacientes declinó de forma sustancial, pasando a ser la localización de cabeza y cuello con un menor riesgo de aparición de segunda neoplasia, tal como puede apreciarse en la siguiente figura.

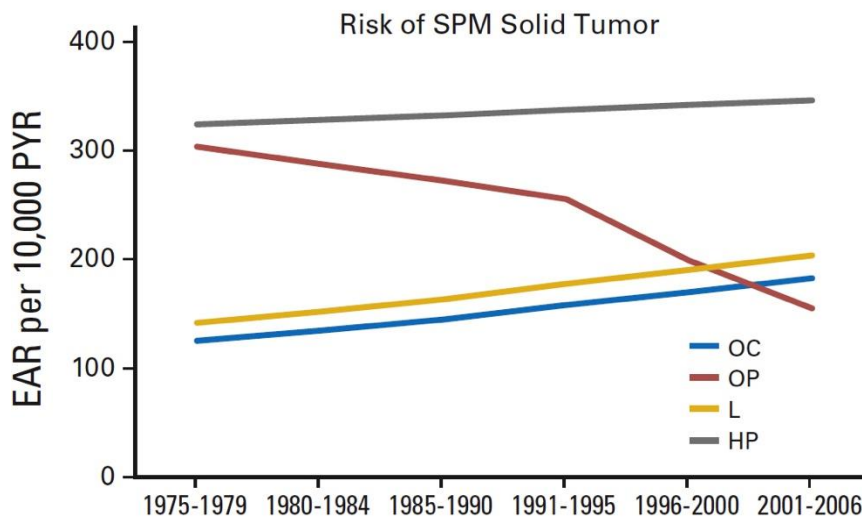


FIGURA 79: Riesgo de segundas neoplasias en pacientes con antecedentes de carcinomas de cavidad oral (OC), orofaringe (OP), laringe (L) e hipofaringe (HP). (Tomada de Morris¹⁹³).

Al analizar la causa por la que se produjo esta disminución en el riesgo de aparición de segundas neoplasias en los carcinomas de orofaringe, especialmente a partir del 1990, pudo evidenciarse como el descenso en incidencia apareció de forma mayoritaria a expensas de una reducción en el riesgo de aparición de segundos tumores localizados en las vías aerodigestivas (cabeza y cuello, pulmón y esófago). De acuerdo con los autores, una justificación de estos resultados sería la aparición de una nueva modalidad de carcinomas de localización orofaríngea relacionados carcinogénicamente con la infección por HPV, que contarían con un menor riesgo de incidencia de

aparición de segundas neoplasias respecto a los carcinomas escamosos que se relacionan con la agentes carcinogénicos clásicos como son el tabaco y el alcohol.

Gan y cols¹⁹⁴ evaluaron la incidencia de aparición de segundas neoplasias en 2,230 pacientes con un tumor índice de cabeza y cuello tratados en el M.D. Anderson Cancer Center (USA) entre 1995-2010 en función de que el tumor contase con una localización orofaríngea (n=1,070, 48%) o fuera de la orofaringe (n=1,160, 52%). Durante el periodo de seguimiento, un 10.6% de los pacientes desarrolló una segunda neoplasia. Los pacientes con tumores orofaríngeos contaron con una incidencia anual del 1%, en tanto que para los pacientes con tumores fuera de la orofaringe fue del 2%. Existieron diferencias significativas en la supervivencia libre de segunda neoplasia en función de la localización del tumor primario ($p < 0.001$).

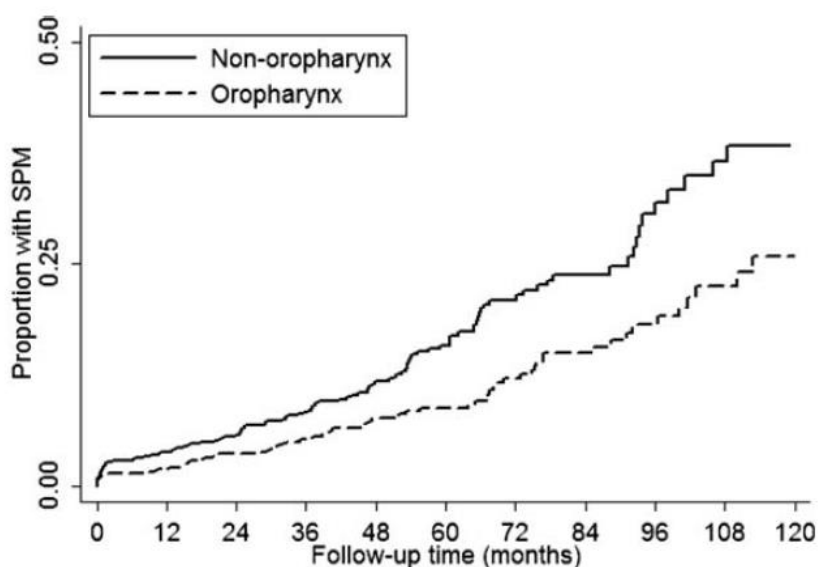


FIGURA 80: Riesgo de segundas neoplasias en pacientes con antecedentes de carcinomas de orofaringe y no-orofaringe (tomada de Gan¹⁹⁴).

De acuerdo con los resultados del estudio, la variable que se relacionó de forma más significativa con el riesgo de aparición de una segunda neoplasia fue el antecedente de tabaquismo.

Una de las limitaciones del estudio fue que no se dispuso de información referente al estatus HPV de los pacientes analizados. Sin embargo, los pacientes con un tumor orofaríngeo y el perfil típico del tumor relacionado con

HPV (menores de 60 años, no fumadores, con tumores localizados en la amígdala o base de lengua) contaron con un riesgo significativamente inferior de segundas neoplasias que los pacientes con carcinomas orofaríngeos con fenotipo no-HPV (OR 0.4, IC 95%:0.2-0.7).

Peck y cols¹⁹⁵ analizaron 182 pacientes con tumores índice de cabeza y cuello de esta cohorte del M.D. Anderson para los cuales se dispuso de información relativa a la serología frente al HPV. Un 44% de los pacientes presentaron seropositividad frente a HPV. Los pacientes HPV-seropositivos mostraron una menor incidencia de aparición de segundas neoplasias que los HPV seronegativos (p=0.051).

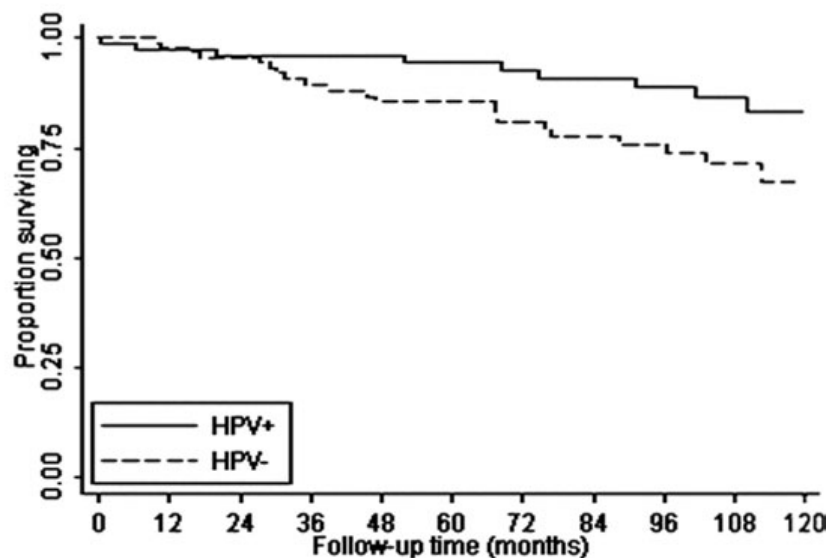


FIGURA 81: Supervivencia libre de enfermedad en el grupo de pacientes con segundas neoplasias (tomada de Peck¹⁹⁵).

El riesgo de aparición de segundas neoplasias para los pacientes HPV-seropositivos se redujo a la mitad respecto a los negativos (HR 0.48, IC 95%: 0.23-1.02, p=0.056).

Al analizar el riesgo de aparición de segundas neoplasias incluyendo como variable el antecedente en el uso de tabaco, los pacientes HPV-seropositivos con antecedente de tabaquismo contaron con un riesgo de aparición de segundas neoplasias similar al de los pacientes seronegativos, en tanto que el riesgo para los pacientes HPV-positivos no fumadores fue significativamente inferior.

Además, la localización de las segundas neoplasias para los pacientes HPV-seronegativos fue mayoritariamente la característica en los CECC (cabeza y cuello, pulmón, esófago y vejiga), en tanto que 7 de las 10 segundas neoplasias en los pacientes seropositivos aparecieron fuera de estas localizaciones típicas.

En un estudio realizado por Hafkamp y cols¹⁸⁸ en que se evaluaron 81 pacientes con carcinomas amigdalares, sólo los pacientes HPV- contaron con la aparición de segundas neoplasias (13%).

Huang y cols¹⁹⁶ evaluaron 103 pacientes con tumores iniciales de cavidad oral (estadios I-II) tratados quirúrgicamente en Taiwan durante el periodo 1997-200, y analizaron la incidencia de aparición de segundas neoplasias en función del estatus HPV. Un 30.1% de los pacientes (n=31) fueron HPV+, contando preferentemente con los genotipos 16 (n=16) y 18 (n=7). Una mayoría de los pacientes contaban con el antecedente de tabaquismo (87.4%) o enolismo (69.9%). Un total de 13 pacientes desarrollaron una segunda neoplasia, sin que apareciese relación entre su aparición y el estatus HPV (P=0.750). Cuatro de los pacientes HPV+ desarrollaron una segunda neoplasia. En las cuatro ocasiones, el segundo tumor fue también HPV+, contando con un genotipo similar al del tumor índice (HPV-18 en tres ocasiones, y HPV-16 en una), lo que hace suponer una relación en la etiología de ambos tumores.

Resultados del estudio HSP.

Nuestros resultados concuerdan con los comunicados en la literatura por diferentes autores en el sentido que los pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ contaron con una frecuencia de aparición de otros tumores malignos significativamente inferior a la correspondiente a los pacientes HPV-. Los pacientes HPV+ tuvieron una menor frecuencia de antecedentes de tumores malignos diagnosticados de forma previa al tumor de orofaringe que los pacientes HPV- (10.6% versus 27.6%, P=0.012). Igualmente, los pacientes HPV+ tuvieron una menor incidencia de aparición de nuevos tumores malignos

Discusión

con posterioridad al diagnóstico del carcinoma de orofaringe que los pacientes con tumores HPV- (14.9% versus 29.1%, $p=0.041$).

Conclusiones

1. El 12% de todos los pacientes con carcinomas de orofaringe estudiados fueron tumores HPV+. Este porcentaje fue significativamente superior para los pacientes con tumores localizados en la región amigdalara (16.7%) y la base de la lengua (11.2%). El genotipo mayoritario fue el HPV-16, que fue encontrado en un 87.2% de los pacientes HPV+.
2. Se apreció una tendencia hacia el incremento en la incidencia de aparición de tumores HPV+ a lo largo del periodo de estudio, aunque esta tendencia no alcanzó valores de significación estadística.
3. El porcentaje de pacientes con tumores HPV+ fue significativamente superior entre las pacientes del sexo femenino y entre los pacientes que no contaron con el antecedente en el consumo de tóxicos como el tabaco y el alcohol. No encontramos diferencias significativas en la edad de los pacientes en función del estatus HPV.
4. No aparecieron diferencias en la categoría de extensión local de la enfermedad en función del estatus HPV. Por el contrario, los pacientes HPV+ contaron con una categoría de extensión regional de la enfermedad (76% N+) significativamente superior que la de los pacientes HPV- (49% N+).
5. Un 66% de los pacientes HPV+ mostraron también positividad frente a p16. De los pacientes HPV+/p16+, un 96.7% expresaron E6mRNA. De los pacientes HPV+/p16-, un 50% expresaron E6mRNA.
6. Existió una relación significativa entre el estatus HPV y la supervivencia. La supervivencia ajustada a los 5 años para los pacientes HPV+ fue del 69.2%, y para los pacientes HPV- del 49.4%. Esta mejoría en la supervivencia en los pacientes HPV+ apareció a expensas básicamente de los pacientes con tumores con estadios avanzados y de aquellos

Conclusiones

tratados con radioterapia o quimiorradioterapia. De acuerdo con los resultados de un estudio multivariante, y considerando como categoría de referencia a los pacientes HPV+/p16+, los pacientes HPV+/p16- contaron con un riesgo de fallecimiento asociado a la evolución del tumor 2.5 veces superior, y los pacientes HPV- un riesgo de fallecimiento asociado a la evolución del tumor 3.2 veces superior.

7. Los pacientes con carcinomas de orofaringe HPV+ contaron con un riesgo menor de sufrir la aparición de segundas neoplasias (14,9%) que los pacientes con tumores HPV- (29%).

Bibliografía

1. Griffiths M. 'Nuns, virgins, and spinsters'. Rigoni-Stern and cervical cancer revisited. *Br J Obstet Gynaecol.* 1991;98:797-802.
2. Nahmias AJ, Josey WE, Naib ZM, Luce CF, Guest BA. Antibodies to Herpesvirus hominis types 1 and 2 in humans. II. Women with cervical cancer. *Am J Epidemiol.* 1970;91:547-52.
3. Naib ZM, Nahmias AJ, Josey WE, Kramer JH. Genital herpetic infection. Association with cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer.* 1969;23:940-5.
4. Syrjänen S, Syrjänen K. The history of papillomavirus research. *Cent Eur J Public Health.* 2008;16(Suppl):S7-13.
5. Rous P, Smith WE. The neoplastic potentialities of mouse embryo tissues: the findings with skin of c strain embryos transplanted to adult animals. *J Exp Med.* 1945;81:597-620.
6. Rous P, Friedewald WF. The effect of chemical carcinogens on virus-induced rabbit papillomas. *J exp med.* 1944;79:511-38.
7. Klug A, Finch JT. Structure of viruses of the papilloma-polyoma type. I. Human wart virus. *J Mol Biol.* 1965;11:403-23.
8. zur Hausen H, Meinhof W, Scheiber W, Bornkamm GW. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. I. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human wart virus. *Int J Cancer.* 1974;13:650-6.
9. zur Hausen H, Schulte-Holthausen H, Wolf H, Dörries K, Egger H. Attempts to detect virus-specific DNA in human tumors. II. Nucleic acid hybridizations with complementary RNA of human herpes group viruses. *Int J Cancer.* 1974;13:657-64.
10. Münger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. *Virus Res.* 2002;89:213-28.
11. de Villiers EM, Fauquet C, Broker TR, Bernard HU, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology.* 2004;324:17- 27.
12. Zheng ZM, Baker CC. Papillomavirus genome structure, expression, and post-transcriptional regulation. *Front Biosci.* 2006;11:2286-302.
13. Chen EY, Howley PM, Levinson AD, Seeburg PH. The primary structure and genetic organization of the bovine papillomavirus type 1 genome. *Nature.* 1982;299:529-34.
14. Danos O, Katinka M, Yaniv M. Human papillomavirus 1a complete DNA sequence: a novel type of genome organization among papovaviridae. *EMBO J.* 1982;1:231-6.

Bibliografía

15. Yamada T, Manos MM, Peto J, Greer CE, Munoz N, Bosch FX, et al. Human papillomavirus type 16 sequence variation in cervical cancers: a worldwide perspective. *J Virol*. 1997;71:2463-72.
16. Ibieta BR, Lizano M, Fras-Mendivil M, Barrera JL, Carrillo A, Ma Ruz-Godoy L, et al. Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;99:311-5.
17. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, et al. V. Use of PGMY primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol*. 2002;40:902-7.
18. Moscicki AB, Shiboski S, Broering J, et al. The natural history of human papillomavirus infection as measured by repeated DNA testing in adolescent and young women. *J Pediatr*. 1998;132:277-84.
19. Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *Int J Cancer*. 2006;118:3030-441.
20. Puig-Tintoré LM, Alba A, Bosch FX, Castellsagué X, Coll C, Cortés X, et al. La infección por papilomavirus. Documento de consenso de la SEGO, SEC y AEPCC. Documentos de Consenso SEGO 2002. Madrid: Ed. Meditex-Sanex 2003;41-104.
21. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998;338:423-8.
22. Richardson H, Kelsall G, Tellier P, Voyer H, Abrahamowicz M, Ferenczy A, et al. The natural history of type-specific human papillomavirus infections in female university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12:485-90.
23. Rodríguez AC, Schiffman M, Herrero R, Wacholder S, Hildesheim A, Castle PE, et al. Proyecto Epidemiológico Guanacaste Group. Rapid clearance of human papillomavirus and implications for clinical focus on persistent infections. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:513-7.
24. Moscicki AB, Hills N, Shiboski S, et al. Risks for incident human papillomavirus infection and low-grade squamous intra-epithelial lesion development in young females. *JAMA*. 2001;285:2995-3002.
25. Moscicki AB, Shiboski S, Hills NK, Powell KJ, Jay N, Hanson EN, et al. Regression of low-grade squamous intra-epithelial lesions in young women. *Lancet*. 2004;364:1678-83.
26. Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol*. 1993;12:186-92.

27. Hakama M, Rasanen-Virtanen U. Effect of a mass screening program on the risk of cervical cancer. *Am J Epidemiol.* 1976;103:512-7.
28. Nobbenhuis MAE, Helmerhorst TJM, Van den Brule AJC, Rozendaal L, Voorhorst FJ, Bezemer PD, et al. Cytological regression and clearance of high-risk human papillomavirus in women with an abnormal cervical smear. *Lancet.* 2001;358: 1782-3.
29. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, et al. The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1072-9.
30. Wang SS, Hildesheim A. Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;31:35-40.
31. Hudelist G, Manavi M, Pischinger KI, Watkins-Riedel T, Singer CF, Cubista E, et al. Physical state and expression of HPV DNA in benign and dysplastic cervical tissue: different levels of viral integration are correlated with lesion grade. *Gynecol Oncol.* 2004;92:873-80.
32. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002;359:1093-101.
33. Davies AA, Smith GD, Harbord R, Bekkering GE, Sterne JAC, Beynon R, et al. Nutritional interventions and outcome in patients with cancer or preinvasive lesions: systematic review. *J Nat Cancer Inst.* 2006;98:961-73.
34. Schwartz, S.M., Daling, J.R., Doody, J.R., Wipf, G.C., Carter, J.J., et al. Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90: 1626–1636.
35. D'Souza, G., Kreimer, A.R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W.M., et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356:1944–1956.
36. Giraldo P, Gonçalves AK, Pereira SA, Barros-Mazon S, Gondo ML, Witkin SS. Human papillomavirus in the oral mucosa of women with genital human papillomavirus lesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2006;126:104-6.
37. Herrero R, Castellsagué X, Pawlita M, Lissowska J, Kee F, Balaram P, et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J Natl Cancer Inst.* 2003;95:1772-83.
38. Hemminki K, Dong C. Cancer in husbands of cervical cancer patients. *Epidemiology.* 2000;11:347-9.

Bibliografia

39. Rintala M, Grénman S, Puranen M, Syrjänen S. Natural history of oral papillomavirus infections in spouses: a prospective Finnish HPV Family Study. *J Clin Virol.* 2006;35:89-94.
40. Hemminki K, Dong C, Frisch M. Tonsillar and other upper aerodigestive tract cancers among cervical cancer patients and their husbands. *Eur J Cancer Prev.* 2000;9:433-7.
41. Termine N, Giovannelli L, Matranga D, Caleca MP, Bellavia C, Perino A, et al. Oral human papillomavirus infection in women with cervical HPV infection: new data from an Italian cohort and a metanalysis of the literature. *Oral Oncol.* 2011;47:244-50.
42. 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.
43. 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 *Pediatr Infect Dis J.* 2007;26:836-40.
44. Saini R, Khim TP, Rahman SA, Ismail M, Tang TH. High-risk human papillomavirus in the oral cavity of women with cervical cancer, and their children. *Viol J.* 2010;7:131.
45. Fakhry C, Gillison ML. Fakhry C, Gillison ML. Clinical implications of human papillomavirus in head and neck cancers. *J Clin Oncol.* 2006;24:2606-11.
46. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med.* 2007;356:1944-56.
47. zur Hausen, H. Human papilloma viruses and their possible role in squamous cell carcinomas. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1977;78:1–30.
48. Newell, G.R., Krementz, E.T., Roberts, J.D. Excess occurrence of cancer of the oral cavity, lung, and bladder following cancer of the cervix. *Cancer.* 1975;36:2155–2158.
49. Syrjänen, K.J., Pyrhönen, S., Syrjänen, S.M., Lamberg, M.A. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg.* 1983;21:147–153.
50. Löning, T., Ikenberg, H., Becker, J., Gissmann, L., Hoepfer, I., zur Hausen, H. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol.* 1985;84:417–420.
51. Weinberger, P.M., Yu, Z., Haffty, B.G., 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;24:736–747.
52. Psyrri, A., DiMaio, D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nature Clin Pract Oncol* 2008;5:24–31.
53. Gillison, M.L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S., et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:407–420.
54. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:467-75.
55. Shiboski, C.H., Schmidt, B.L., Jordan, R.C. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20–44 years. *Cancer*. 2005;103: 1843–1849.
56. 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;26:612-9.
57. Stein AP, Saha S, Yu M, Kimple RJ, Lambert PF. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma in the United States across time. *Chem Res Toxicol*. 2014;27:462-9.
58. Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, Du J, Eriksson M, Giraud G, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*. 2009;125:362-6.
59. Lundberg M, Leivo I, Saarilahti K, Mäkitie AA, Mattila PS. Increased incidence of oropharyngeal cancer and p16 expression. *Acta Otolaryngol*. 2011;131:1008-11.
60. Cerezo L, López C, de la Torre A, Suárez D, Hervás A, Ruiz A, et al. Incidence of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer and outcomes after chemoradiation in a population of heavy smokers. *Head Neck*. 2014;36:782-6.
61. Rodrigo JP, Heideman DA, García-Pedrero JM, Fresno MF, Brakenhoff RH, Díaz Molina JP, et al. Time trends in the prevalence of HPV in oropharyngeal squamous cell carcinomas in northern Spain (1990-2009). *Int J Cancer*. 2014;134:487-92.
62. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol*. 2008;19:1681-90.
63. Mehanna H, Beech T, Nicholson T, El-Hariry I, McConkey C, Paleri V, et al.

Bibliografía

- Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck cancer: systematic review and meta-analysis of trends by time and region. *Head Neck*. 2013;35:747-55.
64. Sanders AE, Slade GD, Patton LL. National prevalence of oral HPV infection and related risk factors in the U.S. adult population. *Oral Dis*. 2012;18:430-41.
65. Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, et al. The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2011;20:172-82.
66. Palmer E, Newcombe RG, Green AC, Kelly C, Noel Gill O, Hall G, et al. Human papillomavirus infection is rare in nonmalignant tonsil tissue in the UK: Implications for tonsil cancer precursor lesions. *Int J Cancer*. 2014;135:2437-43.
67. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst*. 1995;87:796-802.
68. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer. *J Pathol*. 1999;189:12-9.
69. Westra WH. Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: Evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. *Oral Oncol*. 2014;50:771-9.
70. Westra WH. The morphologic profile of hpv-related head and neck squamous carcinoma: implications for diagnosis, prognosis, and clinical management. *Head Neck Pathol* 2012;6(Suppl 1):S48–54.
71. Cohen MA, Basha SR, Reichenbach DK, Robertson E, Sewell DA. Increased viral load correlates with improved survival in hpv-16-associated tonsil carcinoma patients. *Acta Otolaryngol* 2008;128:583–9.
72. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, Lindholm J, Rabbani H, Kalantari M, et al. Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2002;102:152–8.
73. Ukpo OC, Flanagan JJ, Ma XJ, Luo Y, Thorstad WL, Lewis Jr JS. High-risk human papillomavirus e6/e7 mRNA detection by a novel in situ hybridization assay strongly correlates with p16 expression and patient outcomes in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2011;35:1343–50.
74. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, et al. RNAscope: a novel in situ rna analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 2012;14:22–9.

75. 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.
76. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2009;15:6758–62.
77. 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.
78. Lewis Jr JS. P16 immunohistochemistry as a standalone test for risk stratification in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol* 2012;6(Suppl. 1):S75–82.
79. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* 2010;116:2166–73.
80. Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, He X, Pickard R, Koluder M, et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer hpv status determination in us cooperative group trials. *Am J Surg Pathol* 2012;36:945–54.
81. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2013;49:1–8.
82. Chernock RD, Wang X, Gao G, Lewis Jr JS, Zhang Q, Thorstad WL, et al. Detection and significance of human papillomavirus, cdkn2a(p16) and cdkn1a(p21) expression in squamous cell carcinoma of the larynx. *Mod Pathol* 2013;26:223–31.
83. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*. 2007;121:2465-72.
84. Stokley S, Cohn A, Dorell C, Hariri S, Yankey D, Messonnier N, et al. Adolescent vaccination-coverage levels in the United States: 2006-2009. *Pediatrics*. 2011;128:1078-86.
85. Martínez-Boix y cols. Revisión del Programa de Vacunación frente a Virus del Papiloma Humano en España. Ponencia de Programa y Registro de Vacunaciones. Grupo de trabajo HPV 2012. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. 2013.
86. Durst M, Gissmann L, Ikenberg H, et al: A papillomavirus DNA from a cervical

- carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proc Natl Acad Sci*;1983;80:3812-3815.
87. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, et al: A new type of papillomavirus DNA and its prevalence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *EMBO J*,1984;3:1151- 1157.
88. 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;101:412-23.
89. Wilting, S. M., Smeets, S. J., Snijders, P. J., van Wieringen, W. N., van de Wiel, M. A., Meijer, et al. Genomic profiling identifies common HPV-associated chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of cervix and head and neck. *BMC Med Genomics* 2009;2:32.
90. Martinez, I., Wang, J., Hobson, K. F., Ferris, R. L. and Khan, S. A. Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cancer* 2007;43:415–432.
91. Lohavanichbutr, P., Houck, J., Fan, W., Yueh, B., Mendez, E., Futran, N., et al. Genomewide gene expression profiles of HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer: potential implications for treatment choices. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2009;135:180–188.
92. Klussmann, J. P., Mooren, J. J., Lehnen, M., Claessen, S. M., Stenner, M., Huebbers, C. U., et al. Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin. Cancer Res.* 2009;15:1779–1786.
93. Schlecht, N. F., Burk, R. D., Adrien, L., Dunne, A., Kawachi, N., Sarta, C., et al. Gene expression profiles in HPV-infected head and neck cancer. *J. Pathol.* 2007;213:283–293.
94. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 2011;333:1157–1160.
95. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 2011;333:1154–1157.
96. 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;24:736-747.
97. Slebos RJ, Yi Y, Ely K, Carter J, Evjen A, Zhang X, et al. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck

- squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res: Official J Am Assoc Cancer Res* 2006;12:701–709.
98. Mirghani H, Ugolin N, Ory C, Lefèvre M, Baulande S, Hofman P, St Guily JL, Chevillard S, Lacave R. A predictive transcriptomic signature of oropharyngeal cancer according to HPV16 status exclusively. *Oral Oncol.* 2014;50:1025-1034.
99. Rampias T, Boutati E, Pectasides E, Sasaki C, Kountourakis P, Weinberger P, et al. Activation of Wnt signaling pathway by human papillomavirus E6 and E7 oncogenes in HPV16-positive oropharyngeal squamous carcinoma cells. *Mol Cancer Res* 2010;8:433–443.
100. van der Meide WF, et al. Promoter methylation analysis of WNT/beta catenin signaling pathway regulators to detect adenocarcinoma or its precursor lesion of the cervix. *Gynecol Oncol* 2011;123:116–122.
101. Chun SH, Jung CK, Won HS, Kang JH, Kim YS, Kim MS. Divergence of P53, PTEN, PI3K, Akt and mTOR expression in tonsillar cancer. *Head Neck.* 2014;25.
102. Surviladze Z, Sterk RT, DeHaro SA, Ozbun MA. Cellular entry of human papillomavirus type 16 involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mTOR pathway and inhibition of autophagy. *J Virol* 2013;87:2508–2517.
103. Brimer N, Lyons C, Wallberg AE, Vande Pol SB. Cutaneous papillomavirus E6 oncoproteins associate with MAML1 to repress transactivation and NOTCH signaling. *Oncogene* 2012;31:4639–4646.
104. Tan MJ, White EA, Sowa ME, Harper JW, Aster JC, Howley PM. Cutaneous betahumanpapillomavirus E6 proteins bind Mastermind-like coactivators and repress Notch signaling. *Proc Nat Acad Sci USA* 2012;109:E1473–1480.
105. Rampias T, Pectasides E, Prasad M, Sasaki C, Gouveris P, Dimou A, et al. Molecular profile of head and neck squamous cell carcinomas bearing p16 high phenotype. *Ann Oncol* 2013;24:2124-2131.
106. Zhang M, Kumar B, Piao L, Xie X, Schmitt A, Arradaza N, et al. Elevated intrinsic cancer stem cell population in human papillomavirus-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 2014;120:992-1001.
107. Wald AI, Hoskins EE, Wells SI, Ferris RL, Khan SA. Alteration of microRNA profiles in squamous cell carcinoma of the head and neck cell lines by human papillomavirus. *Head Neck.* 2011;33:504-12.
108. Lajer CB, Garnæs E, Friis-Hansen L, Norrild B, Therkildsen MH, Glud M, et al. The role of miRNAs in human papilloma virus (HPV)-associated cancers: bridging between HPV-related head and neck cancer and cervical cancer. *Br J Cancer.* 2012;106:1526-34.

109. Gupta AK, Lee JH, Wilke WW, Quon H, Smith G, Maity A, et al. Radiation response in two HPV-infected head-and-neck cancer cell lines in comparison to a non-HPV-infected cell line and relationship to signaling through AKT. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009;74:928-33.
110. Arenz A, Ziemann F, Mayer C, Wittig A, Dreffke K, Preising S, et al. Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancer cell lines due to cell cycle dysregulation and induction of apoptosis. *Strahlenther Onkol* 2014;190:839-46.
111. Sørensen BS, Busk M, Olthof N, Speel EJ, Horsman MR, Alsner J, et al. Radiosensitivity and effect of hypoxia in HPV positive head and neck cancer cells. *Radiother Oncol.* 2013;108:500-5.
112. Nagel R, Martens-de Kemp SR, Buijze M, Jacobs G, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. Treatment response of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol* 2013;49:560-566.
113. Spanos WC, Nowicki P, Lee DW, Hoover A, Hostager B, Gupta A, et al. Immune response during therapy with cisplatin or radiation for human papillomavirus-related head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2009;135:1137-1146.
114. Vu HL, Sikora AG, Fu S, Kao J. HPV-induced oropharyngeal cancer, immune response and response to therapy. *Cancer Lett.* 2010;288:149-55.
115. Sirianni N, Wang J, Ferris RL. Antiviral activity of Cidofovir on a naturally human papillomavirus-16 infected squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) cell line improves radiation sensitivity. *Oral Oncol.* 2005;41:423-8.
116. León X, Orús C, Quer M. Diseño, mantenimiento, y explotación de una base de datos oncológica para pacientes con tumores malignos de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp.* 2002;53:185-90.
117. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol.* 2010;11:781-9.
118. Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer.* 2011;129:733-41.
119. Garnaes E, Kiss K, Andersen L, Therkildsen MH, Franzmann MB, Filtenborg-Barnkob B, et al. A high and increasing HPV prevalence in tonsillar cancers in Eastern Denmark, 2000-2010: The largest registry-based study to date. *Int J Cancer.* 2014;136:2196-203.
120. Ljøkjel B, Lybak S, Haave H, Olofsson J, Vintermyr OK, Aarstad HJ. The impact of HPV infection on survival in a geographically defined cohort of oropharynx

- squamous cell carcinoma (OPSCC) patients in whom surgical treatment has been one main treatment. *Acta Otolaryngol* 2014;134:636-645.
121. St Guily JL, Jacquard AC, Prétet JL, Haesebaert J, Beby-Defaux A, Clavel C, et al. Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France--The EDiTH VI study. *J Clin Virol*. 2011;51:100-4.
122. Hama T, Tokumaru Y, Fujii M, Yane K, Okami K, Kato K, et al. Prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer: a multicenter study in Japan *Oncology*. 2014;87:173-82.
123. Cerezo L, de la Torre A, Hervás A, Ruiz A, Liñán O, López M, et al. Oropharyngeal cancer related to Human Papilloma Virus: incidence and prognosis in Madrid, Spain. *Clin Transl Oncol*. 2014;16:301-6.
124. Fernandez E, Schiaffino A, Borràs JM, Shafey O, Villalbí JR, La Vecchia C. Prevalence of cigarette smoking by birth cohort among males and females in Spain, 1910-1990. *Eur J Cancer Prev*. 2003;12:57-62.
125. Smith JS, Melendy A, Rana RK, Pimenta JM. Age-specific prevalence of infection with human papillomavirus in females: a global review. *J Adolesc Health*. 2008;43(4 Suppl):S5-25, S25.e1-41.
126. Jo VY, Mills SE, Stoler MH, Stelow EB. Papillary squamous cell carcinoma of the head and neck: frequent association with human papillomavirus infection and invasive carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2009;33:1720-4.
127. Begum S, Westra WH. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status. *Am J Surg Pathol*. 2008;32:1044-50.
128. Singhi AD, Stelow EB, Mills SE, Westra WH. Lymphoepithelial-like carcinoma of the oropharynx: a morphologic variant of HPV-related head and neck carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2010;34:800-5.
129. Goldenberg D, Begum S, Westra WH, Khan Z, Sciubba J, Pai SI, et al. Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon. *Head Neck*. 2008;30:898-903.
130. Morani AC, Eisbruch A, Carey TE, Hauff SJ, Walline HM, Mukherji SK. Intranodal cystic changes: a potential radiologic signature/biomarker to assess the human papillomavirus status of cases with oropharyngeal malignancies. *J Comput Assist Tomogr* 2013;37:343-345.
131. Yasui T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T, Takenaka Y, Nakahara S, et al. Human papillomavirus and cystic node metastasis in oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary origin. *PLoS One* 2014;9:e95364.

Bibliografia

132. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:709-720.
133. Mellin H, Friesland S, Lewensohn R, Dalianis T, Munck-Wikland E. Human papillomavirus (HPV) DNA in tonsillar cancer: clinical correlates, risk of relapse, and survival. *Int J Cancer*. 2000 20;89:300-304.
134. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Sasaki C, et al. Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:5684-5691.
135. Ringström E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res*. 2002;8:3187-92.
136. Kong CS, Narasimhan B, Cao H, Kwok S, Erickson JP, Koong A, et al. The relationship between human papillomavirus status and other molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009;74:553-61.
137. Rades D, Seibold ND, Gebhard MP, Noack F, Schild SE, Thorns C. Prognostic factors (including HPV status) for irradiation of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Strahlenther Onkol*. 2011;187:626-32.
138. Snietura M, Piglowski W, Jaworska M, Mucha-Malecka A, Wozniak G, Lange D, et al. Impact of HPV infection on the clinical outcome of p-CAIR trial in head and neck cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011;268:721-6.
139. Lau HY, Brar S, Klimowicz AC, Petrillo SK, Hao D, Brockton NT, et al. Prognostic significance of p16 in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck treated with concurrent cisplatin and radiotherapy. *Head Neck*. 2011;33:251-6.
140. Lassen P, Eriksen JG, Krogdahl A, Therkildsen MH, Uihøi BP, Overgaard M, Specht L, et al. The influence of HPV-associated p16-expression on accelerated fractionated radiotherapy in head and neck cancer: evaluation of the randomised DAHANCA 6&7 trial. *Radiother Oncol*. 2011;100:49-55.
141. Chen AM, Zahra T, Daly ME, Farwell DG, Luu Q, Gandour-Edwards R, et al. Definitive radiation therapy without chemotherapy for human papillomavirus-positive head and neck cancer. *Head Neck*. 2013;35:1652-6.
142. Gavid M, Pillet S, Pozzetto B, Oriol M, Dumollard JM, Timoshenko AP, et al. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinomas in the South-East of France: prevalence, viral expression, and prognostic implications. *Acta Otolaryngol*. 2013;133:538-43.

143. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, McNeil EB, Scolyer RA, Cossart YE, et al. Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer*. 2003;106:553-558.
144. Klozar J, Kratochvil V, Salakova M, Smahelova J, Vesela E, Hamsikova E, et al. HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008;265 (Suppl 1):S75-82.
145. Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, Claessen SM, Stenner M, Huebbers CU, et al. Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res*. 2009;15:1779-86.
146. Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, Palermo R, Best S, Ulmer KM, et al. Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*. 2009;119:1542-9.
147. Rischin D, Young RJ, Fisher R, Fox SB, Le QT, Peters LJ, et al. Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *J Clin Oncol*. 2010;28:4142-8.
148. Posner MR, Lorch JH, Goloubeva O, Tan M, Schumaker LM, Sarlis NJ, et al. Survival and human papillomavirus in oropharynx cancer in TAX 324: a subset analysis from an international phase III trial. *Ann Oncol*. 2011;22:1071-7.
149. Gao G1, Chernock RD, Gay HA, Thorstad WL, Zhang TR, Wang H, et al. A novel RT-PCR method for quantification of human papillomavirus transcripts in archived tissues and its application in oropharyngeal cancer prognosis. *Int J Cancer*. 2013;132:882-90.
150. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med*. 2010;363:24-35.
151. Semrau R, Duerbaum H, Temming S, Huebbers C, Stenner M, Drebber U, et al. Prognostic impact of human papillomavirus status, survivin, and epidermal growth factor receptor expression on survival in patients treated with radiochemotherapy for very advanced nonresectable oropharyngeal cancer. *Head Neck*. 2013;35:1339-44.
152. Chen AM, Li J, Beckett LA, Zhara T, Farwell G, Lau DH, et al. Differential response rates to irradiation among patients with human papillomavirus positive and negative oropharyngeal cancer. *Laryngoscope*. 2013;123:152-7.
153. Maxwell JH, Kumar B, Feng FY, Worden FP, Lee JS, Eisbruch A, et al. Tobacco use in human papillomavirus-positive advanced oropharynx cancer patients related to increased risk of distant metastases and tumor recurrence. *Clin Cancer Res*. 2010;16:1226-35.

154. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:261-269.
155. Smith EM, Wang D, Kim Y, Rubenstein LM, Lee JH, Haugen TH, et al. P16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2008;44:133-142.
156. Jung AC, Briolat J, Millon R, de Reyniès A, Rickman D, Thomas E, et al. Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2010;126:1882-94.
157. Smith EM, Wang D, Rubenstein LM, Morris WA, Turek LP, Haugen TH. Association between p53 and human papillomavirus in head and neck cancer survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17:421-427.
158. Gao G, Gay HA, Chernock RD, Zhang TR, Luo J, Thorstad WL, et al. A microRNA expression signature for the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2013;119:72-80.
159. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, Stützer H, Preuss SF, Hoffmann TK, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer.* 2007;120:1731-8.
160. de Jong MC, Pramana J, Kneijens JL, Balm AJ, van den Brekel MW, et al. HPV and high-risk gene expression profiles predict response to chemoradiotherapy in head and neck cancer, independent of clinical factors. *Radiother Oncol.* 2010;95:365-70.
161. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer.* 2010;126:1256-62.
162. Saito Y, Yoshida M, Ushiku T, Omura G, Ebihara Y, Shimono T, et al. Prognostic value of p16 expression and alcohol consumption in Japanese patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2013;119:2005-11.
163. Pajares B, Perez-Villa L, Trigo JM, Toledo MD, Alvarez M, Jimenez B, et al. Concurrent radiotherapy plus epidermal growth factor receptor inhibitors in patients with human papillomavirus-related head and neck cancer. *Clin Transl Oncol.* 2014;16:418-24.
164. Sethi S, Ali-Fehmi R, Franceschi S, Struijk L, van Doorn LJ, Quint W, Albashiti B, Ibrahim M, Kato I. Characteristics and survival of head and neck cancer by HPV status: a cancer registry-based study. *Int J Cancer.* 2012;131:1179-86.

165. López RV, Levi JE, Eluf-Neto J, Koifman RJ, Koifman S, Curado MP, et. Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. *Cancer Causes Control*. 2014;25:461-71.
166. Lin BM, Wang H, D'Souza G, Zhang Z, Fakhry C, Joseph AW, et al. Long-term prognosis and risk factors among patients with HPV-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2013;119:3462-3471.
167. Straetmans JM, Olthof N, Mooren JJ, de Jong J, Speel EJ, Kremer B. Human papillomavirus reduces the prognostic value of nodal involvement in tonsillar squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*. 2009;119:1951-7.
168. Ward MJ, Mellows T, Harris S, Webb A, Patel NN, Cox HJ, et al. Staging and treatment of oropharyngeal cancer in the human papillomavirus era. *Head Neck* 2014;3:13-8.
169. Mackenzie P, Pryor D, Burmeister E, Foote M, Panizza B, Burmeister B, et al. T-category Remains an Important Prognostic Factor for Oropharyngeal Carcinoma in the Era of Human Papillomavirus. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2014;26:643-7.
170. Spector ME, Gallagher KK, Bellile E, Chinn SB, Ibrahim M, Byrd S, et al. Patterns of nodal metastasis and prognosis in human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Neck*.2014;36:1233-1240.
171. Joo YH, Jung CK, Sun DI, Park JO, Cho KJ, Kim MS. High-risk human papillomavirus and cervical lymph node metastasis in patients with oropharyngeal cancer. *Head Neck*. 2012;34:10-4.
172. de Juan J, García J, López M, Orús C, Esteller E, Quer M, et al. Inclusion of extracapsular spread in the pTNM classification system: a proposal for patients with head and neck carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2013;139:483-488.
173. Maxwell JH, Ferris RL, Gooding W, Cunningham D, Mehta V, Kim S, et al. Extracapsular spread in head and neck carcinoma: impact of site and human papillomavirus status. *Cancer* 2013;119:3302-3308.
174. Garden AS, Gunn GB, Hessel A, Beadle BM, Ahmed S, El-Naggar AK, et al. Management of the lymph node-positive neck in the patient with human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Cancer* 2014;120:3082-8.
175. O'Sullivan B, Huang SH, Perez-Ordóñez B, Massey C, Siu LL, Weinreb I, et al. Outcomes of HPV-related oropharyngeal cancer patients treated by radiotherapy alone using altered fractionation. *Radiother Oncol*. 2012;103:49-56.
176. O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL, Waldron J, Zhao H, Perez-Ordóñez B, et al. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related

Bibliografia

- oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *J Clin Oncol.* 2013;31:543-50.
177. Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tan PF, Rosenthal D, El-Naggar A, Garden AS, et al. Human Papillomavirus and Overall Survival After Progression of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Oncol.* 2014;32:3365-3373.
178. Argiris A, Li S, Ghebremichael M, Egloff AM, Wang L, Forastiere AA, Burtneess B, et al. Prognostic significance of human papillomavirus in recurrent or metastatic head and neck cancer: an analysis of Eastern Cooperative Oncology Group trials. *Ann Oncol* 2014;25:1410-1416.
179. Vainshtein J, McHugh JB, Spector ME, Walline HM, Komarck CM, Stenmark MH, et al. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer: HPV and p16 status in the recurrent versus parent tumor. *Head Neck.* 2015;37:8-11.
180. Ragin CC, Taioli E. Survival of squamous cell carcinoma of the head and neck in relation to human papillomavirus infection: review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 2007;121:1813-20.
181. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. Head Neck Oncol. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol.* 2010;2:15.
182. O'Rourke 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;48:1191-1201.
183. Petrelli F, Sarti E, Barni S. Predictive value of human papillomavirus in oropharyngeal carcinoma treated with radiotherapy: An updated systematic review and meta-analysis of 30 trials. *Head Neck*, in press.
184. Maxwell JH, Kumar B, Feng FY, Worden FP, Lee JS, Eisbruch A, et al. Tobacco use in human papillomavirus-positive advanced oropharynx cancer patients related to increased risk of distant metastases and tumor recurrence. *Clin Cancer Res.* 2010;16:1226-35.
185. Gillison ML, Zhang Q, Jordan R, Xiao W, Westra WH, Trotti A, et al. Tobacco smoking and increased risk of death and progression for patients with p16-positive and p16-negative oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30:2102-11.
186. Laco J, Nekvindova J, Novakova V, Celakovsky P, Dolezalova H, Tucek L, et al. Biologic importance and prognostic significance of selected clinicopathological parameters in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, with emphasis on smoking, protein p16(INK4a) expression, and HPV status. *Neoplasma.* 2012;59:398-408.

187. Zhao N, Ang MK, Yin XY, Patel MR, Fritchie K, Thorne L, et al. Different cellular p16(INK4a) localisation may signal different survival outcomes in head and neck cancer. *Br J Cancer*. 2012;107:482-90.
188. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, et al. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer*. 2008;122:2656-64.
189. Hong AM, Martin A, Chatfield M, Jones D, Zhang M, Armstrong B, et al. Human papillomavirus, smoking status and outcomes in tonsillar squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2013;132:2748-54.
190. León X, Quer M, Diez S, Orús C, López-Pousa A, Burgués J. Second neoplasm in patients with head and neck cancer. *Head Neck*. 1999;21:204-10.
191. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6:963-8.
192. Joseph AW, Ogawa T, Bishop JA, Lyford-Pike S, Chang X, Phelps TH, et al. Molecular etiology of second primary tumors in contralateral tonsils of human papillomavirus-associated index tonsillar carcinomas. *Oral Oncol*. 2013;49:244-8.
193. Morris LG, Sikora AG, Patel SG, Hayes RB, Ganly I. Second primary cancers after an index head and neck cancer: subsite-specific trends in the era of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29:739-46.
194. Gan SJ, Dahlstrom KR, Peck BW, Caywood W, Li G, Wei Q, et al. Incidence and pattern of second primary malignancies in patients with index oropharyngeal cancers versus index nonoropharyngeal head and neck cancers. *Cancer*. 2013;119:2593-601.
195. Peck BW, Dahlstrom KR, Gan SJ, Caywood W, Li G, Wei Q, et al. Low risk of second primary malignancies among never smokers with human papillomavirus-associated index oropharyngeal cancers. *Head Neck*. 2013;35:794-9.
196. Huang SF, Li HF, Liao CT, Wang HM, Chen IH, Chang JT, et al. Association of HPV infections with second primary tumors in early-staged oral cavity cancer. *Oral Dis*. 2012;18:809-15.