



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**TESIS DOCTORAL**

**IMPLICACIÓN PRONÓSTICA DE LA  
INFECCIÓN POR VIRUS DEL  
PAPILOMA HUMANO EN TUMORES DE  
OROFARINGE Y CAVIDAD ORAL  
LOCALMENTE AVANZADOS E  
IRRESECABLES**

**Víctor Rodríguez Freixinós**

Barcelona, 2017



UAB - Facultat de Medicina. Departament de Medicina



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

Facultad de Medicina  
Departamento de Medicina  
Programa Doctorado en Medicina

**IMPLICACIÓN PRONÓSTICA DE LA INFECCIÓN  
POR VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO EN  
TUMORES DE OROFARINGE Y CAVIDAD ORAL  
LOCALMENTE AVANZADOS E IRRESECCABLES**

**TESIS DOCTORAL**

**Director:**

Jordi Giralt Lopez de Sagredo  
Departamento de Medicina  
Universitat Autònoma de Barcelona

**Co-Director:**

Aleix Prat Aparicio  
Departamento de Medicina  
Universitat de Barcelona

**VÍCTOR RODRÍGUEZ FREIXINÓS**

Barcelona, 2017

A mi mujer e hijos.

A mis padres y hermano.

## **AGRADECIMIENTOS**

*A mis padres Paco y Pilar, por su apoyo incondicional, el respeto y los valores inculcados.*

*A mi hermano Guillermo, ahora lejos pero siempre cerca.*

*A mi mujer Neda y mis hijos Luka y Hugo, por hacerme tan feliz.*

*A mi familia.*

*Al Dr. Jordi Giralt y al Dr. Aleix Prat, directores de mi trabajo de tesis, por su ayuda y guía. Ha sido un placer.*

*Muchas gracias a la Dra. Ana María Martínez de Castro, por su incalculable ayuda en la elaboración de este trabajo.*

*Gracias a los Dres. Javier Hernández, Margarita Alberola y a Patricia Galván por su ayuda y colaboración en la realización de los análisis moleculares.*

*Gracias al Dr. Rodrigo Dienstmann, a Guillermo Villacampa y Laia Paré por la ayuda en el análisis estadístico y su interpretación.*

*Al Dr. Josep María del Campo y la Dra Ana Oaknin, mis mentores. Siempre agradecido.*

## SUMARIO

1. Introducción y antecedentes de los tumores escamosos de cabeza y cuello .....	9
1.1 Preámbulo .....	9
1.2 Epidemiología .....	10
1.3. Factores de riesgo .....	12
1.4. Histopatología y Carcinogénesis .....	13
1.4.1 Epitelio normal y lesiones precursoras de los tumores escamosos de cabeza y cuello .....	13
1.4.2 Inestabilidad genética y carcinogénesis de los tumores escamosos de cabeza y cuello no relacionados con la infección por HPV .....	14
1.5 Localizaciones anatómicas de los tumores escamosos de cabeza y cuello	16
1.5.1 Tumores escamosos de Orofaringe .....	16
1.5.2 Tumores escamosos de Cavidad Oral .....	17
1.6 Diagnóstico y Estadificación de tumores escamosos de cabeza y cuello...	18
1.6.1 Diagnóstico .....	18
1.6.1.1 Diagnóstico clínico-histológico.....	18
1.6.1.2 Diagnóstico radiológico .....	19
1.6.2 Estadificación .....	20
1.6.2.1 Estadificación de los tumores escamosos de orofaringe no relacionados con la infección por HPV.....	21
1.6.2.2 Estadificación de los tumores escamosos de cavidad oral no relacionados con la infección por HPV.....	22
1.7 Tratamiento de los tumores escamosos de cabeza y cuello localmente avanzados.....	24
1.7.1 Tratamiento de los tumores escamosos de cabeza y cuello localmente avanzados y resecables.....	24
1.7.1.1 Cirugía .....	24
1.7.1.2 Radioterapia.....	28
1.7.1.3 Radioterapia y Quimioterapia adyuvante .....	29
1.7.2 Tratamiento de los tumores escamosos de cabeza y cuello localmente avanzados e irresecables: Estrategias de preservación de órgano .....	30
1.7.2.1 Quimioradioterapia concomitante .....	30
1.7.2.2 Tratamiento Anti-EGFR concomitante con Radioterapia.....	34
1.7.2.3 Quimioterapia de inducción .....	36
1.8 Virus del Papiloma Humano.....	42
1.8.1 Introducción y Clasificación .....	42
1.8.2 Epidemiología y Factores de riesgo .....	42
1.8.3 Prevención y Vacunación.....	43
1.8.4 Carcinogénesis inducida por el Virus del Papiloma Humano .....	44
1.8.5 Diagnóstico .....	46

1.8.5.1 Detección del RNA viral por qRT-PCR.....	47
1.8.5.2 Inmunohistoquímica de p16INK (IHC-p16):.....	48
1.8.5.3 Detección del DNA viral por PCR.....	49
1.8.5.4 Hibridación <i>in situ</i> .....	49
1.8.5.5 Correlación PCR/Hibridación <i>in situ</i> -Inmunohistoquímica.....	50
1.8.6 Tumores escamosos de cabeza y cuello relacionados con la infección por HPV .....	51
1.8.6.1 Epidemiología .....	51
1.8.6.2 Presentación clínica.....	54
1.8.6.3 Características moleculares de los tumores escamosos de cabeza y cuello relacionados con la infección por HPV .....	55
1.8.6.4 Impacto pronóstico de la infección por HPV en tumores de cabeza y cuello localmente avanzados .....	58
1.8.6.5 Manejo terapéutico de los tumores de cabeza y cuello relacionados con la infección por HPV. ....	63
2. Justificación del trabajo .....	68
3. Hipótesis .....	71
3.1 Hipótesis principales.....	71
3.2 Hipótesis secundarias:.....	71
4. Objetivos.....	72
4.1 Objetivos principales: .....	72
4.2 Objetivos secundarios .....	72
5. Métodos .....	73
5.1 Tipo de estudio.....	73
5.2 Selección de la muestra y variables .....	73
5.3 Análisis de HPV.....	74
5.3.1 Estudio de HPV mediante PCR .....	74
5.3.2 Estudio de HPV mediante Inmunohistoquímica de p16.....	75
5.4 Análisis genómicos .....	75
5.4.1 Estudios expresión génica mediante la plataforma PAM50 y correlación pronóstica .....	75
5.4.2 Validación de los resultados de expresión génica mediante PAM50 en la base de datos del TCGA de tumores de cabeza y cuello. ....	76
5.5. Estadística .....	76
6. Resultados.....	78
6.1 Características basales de la población global a estudio .....	78
6.2 Resultados de estudios de HPV en la población global a estudio .....	80
6.3 Resultados de eficacia.....	83
6.3.1 Resultados de eficacia en la población global en función de la tasa de respuestas, riesgo de recurrencia y supervivencia global. ....	83



6.3.2 Resultados de eficacia en función de la localización tumoral: Cavidad oral vs Orofaringe .....	88
6.3.3 Resultados de eficacia en función del estatus de HPV (HPV positivos PCR e IHC-p16 vs HPV negativos) .....	91
6.3.4 Resultados de eficacia en función de subgrupos clínicos de riesgo.	93
6.3.5 Resultados de expresión génica .....	94
6.3.5.1 Expresión génica mediante la plataforma PAM50 aplicada a la población global .....	94
6.3.5.2 Correlación de los perfiles de expresión génica identificados mediante la plataforma PAM50 con Supervivencia global y Supervivencia libre de progresión en la población global. ....	95
6.3.5.3 Correlación de los perfiles de expresión génica identificados mediante la plataforma PAM50, ajustados en función del estatus HPV o la localización tumoral .....	98
7. Discusión .....	102
8. Conclusiones.....	116
9. Bibliografía.....	117

# 1. Introducción y antecedentes de los tumores escamosos de cabeza y cuello

## *1.1 Preámbulo*

En la última década, la incidencia de los tumores escamosos de cabeza y cuello relacionados con la infección por el virus del Papiloma Humano (HPV) ha aumentado considerablemente, considerándose este subgrupo como una entidad clínica independiente asociada a unas características etiológicas, clínicas y pronósticas diferenciadas del subgrupo de tumores HPV negativos. La mayoría de los tumores de cabeza y cuello relacionados con la infección por HPV se localizan en orofaringe, estando relacionados con el subtipo HPV-16. De forma global, los tumores HPV positivos, comparados con los tumores HPV negativos, presentan mejor pronóstico, lo que en la actualidad está propiciando el desarrollo de diferentes estrategias terapéuticas específicas para este subgrupo de pacientes.

El tratamiento de los tumores de cabeza y cuello localmente avanzados requiere de un abordaje multidisciplinar que puede llegar a necesitar de la colaboración de diferentes especialidades como otorrinolaringología, cirugía maxilofacial, cirugía plástica, oncología médica y radioterápica, así como servicios de nutrición y soporte. A pesar de la intensidad de los tratamientos administrados, los resultados oncológicos de este grupo de pacientes son limitados y habitualmente se asocian a una elevada comorbilidad. Durante los últimos años se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas con la finalidad de disminuir los efectos secundarios asociados al tratamiento estándar, manteniendo el beneficio oncológico. Las terapias dirigidas contra el factor de crecimiento epidérmico (EGFR), han emergido como una estrategia terapéutica eficaz para el subgrupo de pacientes no candidatos a realizar el tratamiento estándar de quimioterapia a altas dosis.

Aunque el impacto pronóstico de la infección por HPV en tumores de orofaringe se ha establecido, el impacto como factor predictivo de respuesta a los tratamientos de

quimioradioterapia o esquemas de tratamiento biológico combinado de terapia anti-EGFR y radioterapia o quimioterapia de inducción está aún por establecer. Igualmente, el impacto de la infección por HPV en tumores de cabeza y cuello de localizaciones primarias diferentes a la orofaringe, como en nuestro caso serían los tumores de cavidad oral, no está establecido, y por tanto en la actualidad se considera que el tratamiento de los pacientes con tumores HPV positivos debe ser similar al de los pacientes con tumores HPV negativos. En esta línea, la identificación de los factores clínicos y moleculares pronósticos que caractericen a los pacientes con tumores HPV positivos y negativos, permitiría el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas específicas en dichas poblaciones.

En este estudio, proponemos analizar el papel pronóstico de la infección por HPV determinado por dos métodos diagnósticos, como serían la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la inmunohistoquímica (IHQ) de p16, considerado un marcador surrogado de infección por HPV, en pacientes diagnosticados de tumores de cavidad oral y orofaringe localmente avanzado e irresecables, tratados con quimioradioterapia o terapia anti-EGFR/Radioterapia o quimioterapia de inducción, administrados todos ellos con intención curativa. Paralelamente, y como aspecto innovador, mediante análisis de perfiles de expresión génica realizados en las muestras tumorales pretratamiento, describiremos las posibles asociaciones pronósticas de nuestros hallazgos genómicos, así como las posibles diferencias de expresión en función del estatus del HPV y de la localización tumoral.

## ***1.2 Epidemiología***

Los tumores escamosos de cabeza y cuello representan un grupo heterogéneo de tumores que engloba diferentes localizaciones tumorales y factores etiológicos. Globalmente, representan la séptima causa de cáncer en el mundo desarrollado, con una incidencia anual de aproximada de 600000 nuevos casos y más de 300000 muertes relacionadas (1). Se han descrito diferencias en la incidencia de los tumores escamosos de cabeza y cuello en función del área geográfica analizada. Así, en Norte América se consideran la octava causa de cáncer con 55.070 nuevos casos/año en 2014, lo cual representaría el 4% del total de los tumores sólidos, con una mortalidad anual esperada

de 12.000 casos. Por contra, en Europa representan la sexta causa de cáncer con aproximadamente 113.825 nuevos casos/año, siendo la séptima causa más frecuente de muerte por cáncer (2). Estas diferencias en incidencia también se han relacionado con los diferentes factores riesgo asociados a cada población. Así, la incidencia de los tumores de cabeza y cuello relacionados con el tabaco y alcohol, como serían principalmente los tumores de cavidad oral y laringe, ha aumentado principalmente en aquellas zonas geográficas donde el hábito tabáquico continúa siendo importante, como en algunos países del Este y Noreste de Europa, como República Checa, Eslovaquia, Dinamarca y Finlandia o en algunos países de Asia donde el hábito de mascar nuez de betel aumenta la exposición a nitrosaminas con efecto carcinogénico. Sin embargo, la incidencia ha disminuido en aquellos países que han implantado programas de prevención, como en países de Norte América, que han ocasionado que desde 1960 se haya producido una significativa reducción en los hábitos tabáquico y alcohólico (3). También se han descrito diferencias de incidencia y mortalidad en función del sexo y el grado de desarrollo económico del país analizado. Globalmente, los tumores de cabeza y cuello son el doble de frecuentes en hombres, siendo la mortalidad por cáncer de hasta un 80% en países en vías de desarrollo respecto al 40% en los países desarrollados (4). Asimismo, en países desarrollados de Norte América, Europa, Reino Unido, Japón y Australia, donde el consumo de tabaco también ha disminuido, se ha descrito un aumento de los tumores de lengua, base de lengua y amígdala palatina, en los que de forma global el HPV es el principal factor etiológico. Este aumento en incidencia se ha observado tanto en hombres como en mujeres de dichas regiones, aunque de forma global, los tumores de orofaringe son 2-5 veces más frecuentes en hombres que en mujeres (5). La incidencia de los tumores de orofaringe relacionados con la infección del HPV en los Estados Unidos ha presentado un aumento muy significativo, pasando del 15% en los años '80 hasta el 60-80% entre los años 1998-2002, siendo por tanto un claro ejemplo del cambio en el patrón de incidencia de estos tumores. Este aumento ha sido particularmente notorio en hombres blancos, de edad comprendida entre 40-55 años, mientras que ha disminuido significativamente entre hombres afroamericanos y mujeres, lo que estaría relacionado con la baja frecuencia de HPV entre los hombres afroamericanos (aproximadamente 4%) (6, 7). Respecto a los tumores de cavidad oral, su incidencia ha aumentado entre hombres y mujeres del Norte de Europa y Japón, con un significativo aumento entre las mujeres en España (riesgo relativo (RR) = 2.23, 95% CI: 1.73–2.88), mientras que la incidencia ha disminuido en

hombres y mujeres de Asia, India, Canadá y EEUU (8, 9). Otras localizaciones tumorales, como los tumores de laringe, son al menos 5 veces más frecuentes en hombres que en mujeres, con una gran incidencia en hombres de España (30-50 más de riesgo que en mujeres) y hombres afroamericanos (hasta un 50% mayor), lo que nuevamente estaría en relación a la baja frecuencia de HPV en esta población (3). A su vez, los tumores de nasofaringe, son altamente frecuente en Hong Kong, asociados a la infección por virus de Epstein-Barr (10).

### ***1.3. Factores de riesgo***

Clásicamente, tabaco y alcohol han sido considerados los factores de riesgo más importantes asociados a tumores de cabeza y cuello, estimándose que hasta en un 80% de los casos se encontraría esta asociación. Respecto al tabaco, se ha descrito como entre los fumadores, los fumadores de cigarrros, pipas o puros tienen un riesgo hasta 5-25 veces mayor que los no fumadores (11). El riesgo asociado al tabaco se ha correlacionado con la cantidad (>20 cigarrros/día), la edad de inicio (< 18 años) y el periodo total de años que la persona ha fumado (>35 años), aunque es importante remarcar como los fumadores pasivos también presentan mayor riesgo de desarrollar un tumor de cabeza y cuello que los no fumadores, asociándose el cese del hábito tabáquico a una disminución del riesgo relativo, desapareciendo este riesgo tras 20 años sin exposición (12, 13). También se ha descrito un mayor riesgo de tumores de cavidad oral y faringe entre los consumidores de tabaco de mascar (14, 15). En relación con el alcohol, el consumo excesivo (>50 gramos/día) también se ha asociado con hasta 6 veces más de riesgo de desarrollar un tumor de cabeza y cuello, principalmente tumores de laringe, habiéndose descrito como esta asociación de riesgo es independiente al consumo tabáquico (16), aunque por otro lado está establecido el efecto sinérgico carcinogénico del tabaco y alcohol (17). Determinados polimorfismos genéticos asociados a enzimas involucradas en el metabolismo del alcohol, como alcohol deshidrogenasa y aldehído deshidrogenasa, también aumentan el riesgo de desarrollar tumores de cabeza y cuello (18).

Otros factores de riesgo, aunque más infrecuentes, se han descrito asociados con tumores de cabeza y cuello, como serían la radiación ionizante previa, relacionada principalmente con la aparición de tumores de origen sarcomatoide, tiroides y glándulas

salivares en la zona irradiada (19, 20), o determinados factores de predisposición genética principalmente en familiares de primer grado de pacientes con anemia de Fanconi o polimorfismos enzimáticos (21-23). Además de la asociación de riesgo descrita con la infección por HPV, principalmente el HPV-16 (6, 7), también se han descrito otras infecciones virales asociadas a un aumento de riesgo de tumores de cabeza y cuello, como sería el caso del virus Epstein-Barr, considerado agente etiológico primario de tumores nasofaríngeos, principalmente en Asia (10, 24) y la infección por el virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH) (25). Por último se ha descrito como diferentes factores de exposición ambiental, como la exposición a percloroetileno, asbesto, pesticidas, polvo de madera, mostazas nitrogenadas, entre otros, se asociarían a mayor riesgo, especialmente tumores de laringe (26, 27). A su vez, diversos factores dietéticos se han sugerido protectores, como el consumo de fruta y vegetales (28) o favorecedores, como el consumo de carne con altos niveles de nitritos y tumores de nasofaringe (29, 30), aunque la evidencia en estos aspectos es más limitada.

#### ***1.4. Histopatología y Carcinogénesis***

##### **1.4.1 Epitelio normal y lesiones precursoras de los tumores escamosos de cabeza y cuello**

Los tumores de cabeza y cuello derivan en un 90% de los casos del epitelio escamoso superficial de la mucosa, sobre el que una agresión continuada conllevaría una proliferación reactiva de células escamosa (acantosis o hiperplasia escamosa) que mantenida de forma prolongada, provocaría la evolución y dediferenciación celular que podría llegar a presentar hallazgos de atipia o displasia epitelial (queratosis con atipia). La mayoría de estas lesiones hiperplásicas, se corresponden con lesiones en forma de placa blanca hiperqueratósica denominadas leucoplasia. En ausencia de cambios displásicos subyacentes, estas lesiones se consideran lesiones de bajo potencial de malignización, asociadas a menos de un 5% de riesgo de malignizar (31). Se ha descrito una forma más agresiva de leucoplasia, la denominada leucoplasia verrugosa proliferativa, que aunque no presenta rasgos de invasión puede extenderse de forma multifocal siendo refractaria a los tratamientos conservadores y llegando a malignizar hasta en un 50-70% de las ocasiones. En ocasiones, las lesiones hiperplasias pueden

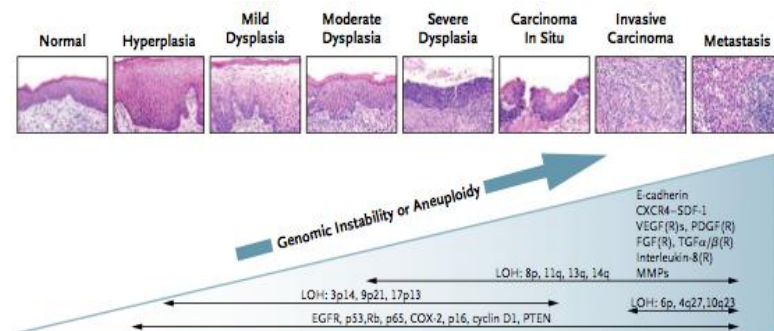
tener apariencia de lesión eritematosa, adyacente a mucosa normal, denominándose eritroplasia, siendo consideradas lesiones premalignas por la frecuente presencia de displasia celular subyacente, con presencia incluso de carcinomas in situ o tumores invasivos en aproximadamente el 40% de los casos. Asimismo, la fibrosis oral submucosa, también se considera una lesión premaligna con potencial de malignización (32). Por tanto, estas lesiones premalignas durante su evolución tienen el potencial de evolucionar hasta carcinoma in situ, con invasión de todo el espesor epitelial mucoso por células atípicas, asociadas a un aumento de actividad mitótica pero sin invasión más allá de la membrana basal (32).

#### **1.4.2 Inestabilidad genética y carcinogénesis de los tumores escamosos de cabeza y cuello no relacionados con la infección por HPV**

Como hemos comentados los tumores de cabeza y cuello engloban a un grupo heterogéneo de tumores con diferentes características clínicas y también biológicas. Los cambios que conllevarían la aparición de un tumor de cabeza y cuello surgido de un epitelio normal o una lesión premaligna son consecuencia de la suma de diferentes alteraciones moleculares que ocurren como consecuencia de la exposición prolongada a un agente carcinógeno. Este modelo de carcinogénesis fue descrita en 1996, mostrando como en las lesiones displásicas era frecuente encontrar presencia de inestabilidad de microsátélites y pérdida de heterocigosidad cromosómica de 3p, 9p y 17p, reflejando fenómenos de carcinogénesis temprana, mientras que otras alteraciones cromosómicas como 11q, 4q y 8p, se observaban frecuentemente en lesiones cancerígenas ya establecidas (33). Así, la pérdida de heterocigosidad cromosómica de 9p21, que conlleva la inactivación del gen supresor tumoral p16*CDKN2A* (p16), se considera un evento genómico temprano que ocurre en hasta el 70% de los tumores de cabeza y cuello, describiéndose también en el epitelio de transición entre mucosa normal e hiperplásica. Otras alteraciones genómicas, como pérdida de 3p y/o mutaciones de 17p14 (localización de TP53), se asociarían con la formación de un grupo de células “hijas”, en las que al presentar las mismas características genómicas, se asociaría una pérdida de control del ciclo celular mediado por TP53, generando por tanto un crecimiento clonal descontrolado que desplazaría al epitelio normal. Evolutivamente, uno de estos subclones celulares podría transformarse mediante la acumulación de

nuevas alteraciones genéticas y generar un cáncer invasivo con capacidad de metastatizar. En este sentido, se han descrito tanto alteraciones genómicas que favorecerían la transición displasia-carcinoma in situ, como pérdida de 11q, 13q, 14q, como alteraciones que controlarían la transición carcinoma in situ-carcinoma invasivo, como las pérdidas de 6p, 8, y 4q (figura 1). Es importante remarcar, que hasta el 35% de los tumores de cavidad oral y orofaringe pueden estar rodeados por epitelio de apariencia macroscópica normal, pero que al realizar estudios genéticos, se identificarían hallazgos displásicos y las alteraciones genéticas previamente descritas, relacionándose este hecho con la elevada proporción de recurrencias locales y segundos tumores primarios que ocurren en los tumores de cabeza y cuello. Este epitelio adyacente y que habitualmente se localiza en los márgenes quirúrgicos se conoce como el nombre de “field” (campo). Al igual que se han descrito las alteraciones genéticas asociadas con la aparición de un tumor primario, también se han descrito genes relacionados con el potencial de metastatización, como serían los genes que codifican E-caderina (CDH1), el factor de crecimiento vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), proteínas del retinoblastoma (pRb), factor de receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), p65, cyclooxygenasa-2 (COX-2), ciclina D1, PTEN y diferentes metaloproteinasas (MMP), entre otros (34-37).

Por tanto, la carcinogénesis de los tumores de cabeza y cuello se basa en un proceso evolutivo complejo en el que la suma de diferentes alteraciones moleculares que ocurren desde las lesiones premalignas, podrían evolucionar y conllevar la aparición de una lesión cancerosa. Este hecho, revela la importancia de los seguimientos estrechos en pacientes de riesgo, con realización de biopsias de la mucosa oral sospechosa, o realización de cepillados celulares como método alternativo y menos invasivo (38, 39).

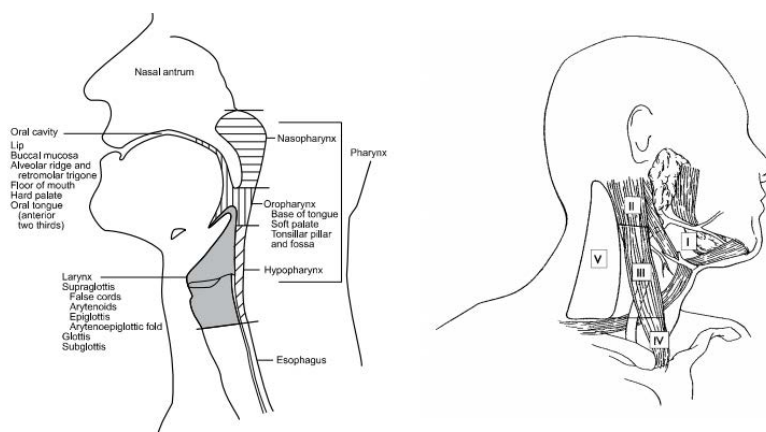




**Figura 1. Modelo de inestabilidad genética y progresión en cáncer de cabeza y cuello.** Figura adaptada de Robert I. et al. Recent Advances in Head and Neck Cancer. N Engl J Med 2008;359:1143-54 (40)

### ***1.5 Localizaciones anatómicas de los tumores escamosos de cabeza y cuello***

Los tumores de cabeza y cuello engloban a una gran variedad de tumores de diferentes localizaciones primarias, clasificándose por tanto en: tumores de cavidad oral, tumores de orofaringe, tumores de nasofaringe, tumores de hipofaringe, tumores de laringe (supraglotis, glotis y subglotis), tumores de cavidad nasal y senos paranasales y por último los tumores de glándulas salivares, todos ellos asociados a una posible afectación ganglionar cervical distribuida en diferentes niveles de afectación clínica (figura 2).



**Figura 2: Localización anatómica de los tumores de cabeza y cuello y niveles de afectación ganglionar cervical.** Figuras adaptadas de NCCN Guidelines Version 2.2017 Head and Neck Cancers (41).

#### **1.5.1 Tumores escamosos de Orofaringe**

Desde el punto de vista anatómico, la orofaringe se encuentra situada entre el paladar blando, como límite superior, y el hueso hioides como límite inferior. Anteriormente se continúa con la cavidad oral, comunica en la parte superior con la nasofaringe y en la parte inferior con la laringe supraglótica e hipofaringe, siendo su soporte la musculatura constrictora y la fascia prevertebral. Por tanto, en los tumores de orofaringe se

incluirían: tumores de base de lengua, incluyendo los pliegues faringoepiglóticos y pliegues glosopiglóticos, lengua (1/3 posterior), paladar blando (incluyendo úvula) y pared posterior y lateral faríngea. Entre estas localizaciones, las más frecuentes son el pilar tonsilar anterior y la amígdala. La orofaringe es extremadamente rica en vasos linfáticos, por lo que la afectación tumoral ganglionar es bastante frecuente, variando entre el 15%-75% de los casos, lo que supone que hasta el 75% de los pacientes pueden presentar estadio III o IV al diagnóstico (41). La forma clínica de presentación, aunque varía en función de la localización tumoral primaria, normalmente consiste en: dolor, disfagia, pérdida de peso, otalgia, trismus (secundaria al compromiso del músculo pterigoideo), fijación de la lengua por infiltración muscular profunda y/o masa cervical.

### **1.5.2 Tumores escamosos de Cavidad Oral**

El cáncer de cavidad oral incluye las siguientes localizaciones: labios, mucosa bucal, trigono retromolar, encía superior e inferior, suelo de boca, paladar duro y los 2/3 anteriores de la lengua. Debido a la importante irrigación linfática que presenta, la cavidad oral supone representa la primera localización anatómica de diseminación tumoral ganglionar en los niveles ganglionares I-III, por tanto aproximadamente un 30% de los pacientes presentarán afectación ganglionar al diagnóstico. Al igual que ocurría en los tumores de orofaringe, éste riesgo varía en función de la localización tumoral primaria, y así mientras que en los tumores de encía o paladar duro la afectación ganglionar es infrecuente, en los tumores de lengua puede ocurrir en hasta un 50-60% de los casos, y de forma uni o bilateral (41). La presentación clínica de los tumores de cavidad oral suele asociarse a la aparición de dolor bucal o úlceras de la mucosa oral no cicatrizantes, así como disfagia, odinofagia, pérdida de peso y otalgia referida. Los tumores de lengua pueden presentarse como lesiones dolorosas exofíticas o infiltrantes y pueden presentar historia de lesiones previas premalignas. Los tumores de labio suelen aparecer en labio inferior como una lesión exofítica o ulcerativa. Una de las particularidades diagnósticas de los tumores de cavidad oral es la importancia de investigar la afectación mandibular y una adecuada evaluación dental y nutricional.

## ***1.6 Diagnóstico y Estadificación de tumores escamosos de cabeza y cuello***

### **1.6.1 Diagnóstico**

#### **1.6.1.1 Diagnóstico clínico-histológico**

La primera aproximación diagnóstica en los pacientes con sospecha de presentar un tumor de cabeza y cuello debe ser la recogida de una historia clínica dirigida a la identificación de posibles factores de riesgo, y de forma paralela llevar a cabo un examen físico exhaustivo, analizando cuidadosamente factores como la movilidad de las cuerdas vocales, presencia de posibles asimetrías anatómicas y la exploración de los diferentes niveles ganglionares. El uso de la endoscopia flexible se recomienda para examinar la mucosa de todas las localizaciones anatómicas, mientras que la exploración bajo anestesia se reservaría para aquellos casos en los que sea necesario delimitar de forma detallada la extensión tumoral o descartar la posibilidad de segundos primarios del área otorrinolaringológica, como ocurre frecuentemente en tumores de hipofaringe o laringe. En este sentido, el uso de la panendoscopia (laringoscopia, broncoscopia y endoscopia) se ha demostrado capaz de identificar hasta un 2.5-4.5% de segundos tumores primarios del tracto aerodigestivo superior (42).

Para llevar a cabo el diagnóstico histológico, se contemplaría desde la toma de una muestra para estudio citológico guiado por biopsia con aguja fina, procedimiento habitual en pacientes con afectación ganglionar sin clara afectación primaria, hasta la toma de biopsia tumoral. El estudio de biopsia con aguja fina presenta una sensibilidad y especificidad superior al 90% (43), pero se han descrito casos negativos en presencia de lesiones quísticas (característico en pacientes con tumores de orofaringe asociados a infección por HPV). Los estudios con aguja fina también estarían indicados en pacientes con afectación ganglionar dudosa detectada en las pruebas radiológicas de estadiaje, en los que se realizaría como forma de confirmar el estadiaje, y por tanto, con importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas.

La histología más frecuente en los tumores de cabeza y cuello es la escamosa, que representa entre el 90-95% de los casos, clasificándose en función del grado de diferenciación celular en: tumores bien diferenciados (>75% queratinización), moderadamente diferenciados (25-75% queratinización) y pobremente diferenciados

(<25% queratinización). Otras histologías mucho más infrecuentes en el área de cabeza y cuello incluirían: histologías verrucosas (variante de los tumores escamosos), adenocarcinomas, adenoides quísticos, sarcomatoides, mucoepidermoides, etc (41).

### **1.6.1.2 Diagnóstico radiológico**

El estadiaje radiológico para los tumores de cabeza y cuello incluiría la realización de: radiografía de tórax, endoscopia y la realización de tomografía computarizada (TC) o resonancia magnética (RMN) para estudio de la extensión locoregional tumoral (tumor primario y afectación ganglionar). La elección de una u otra prueba diagnóstica varía en función de la localización tumoral. Así, el TC puede ayudar a delimitar la afectación de cortex mandibular en tumores de cavidad oral y es particularmente útil a la hora de definir la extensión e infiltración del tejido adyacente peritumoral, lo que es muy relevante para tumores de laringe, en los que la afectación glótica y del cartílago óseo laríngeo determina el abordaje terapéutico. Asimismo, la afectación ganglionar mediastínica y paratraqueal también se pueden detectar de forma óptima con el estudio guiado por TC. A su vez, la RMN ofrece una mejor visualización y delimitación de los márgenes tumorales y tejido blando, por lo que en muchos centros el uso de la RMN se considera estándar en todas las localizaciones tumorales excepto en los tumores laríngeos e hipofaríngeos (44). En general para tumores de cavidad oral, y en congreso tumores de lengua, la RMN aportaría una información muy valiosa respecto la afectación de cartílagos, también en tumores superficiales (45) o para valorar la invasión perineural y de base de cráneo (41).

La valoración de la afectación regional ganglionar es dificultosa, independientemente del método diagnóstico realizado, ya que se asocia a una elevada tasa de resultados falsos positivos y negativos, relacionados principalmente a la alta tasa de necrosis tumoral y cambios postrádicos existente en los tumores de cabeza y cuello. El TC se ha demostrado especialmente sensible para detectar la afectación ganglionar extracapsular (46, 47), considerándose de forma global el TC como método estándar para la valoración de la afectación ganglionar. La realización de pruebas de imagen como el TC de tórax o el PET/PET-TC se consideraría en pacientes con elevado riesgo de enfermedad metastásica o para estudio de segundos tumores primarios, como por ejemplo a nivel pulmonar (48-54). También se considera al PET como prueba útil a la

hora de diferenciar la presencia de una recidiva tumoral o cambios asociados a los tratamientos, principalmente cambios postrádicos, siendo por tanto de interés a la hora de valorar la respuesta al tratamiento (55-67).

## **1.6.2 Estadificación**

Los tumores de cabeza y cuello deben ser estadiados siguiendo el sistema TNM, correspondiente con las siglas en inglés: tumor (T), node (ganglios, N), metastases (metástasis, M), y siguiendo las diferentes clasificaciones propuestas por la “American Joint Committee on Cancer” (AJCC), estando actualmente activa la versión 8º de esta clasificación (68). Siguiendo este sistema, y de forma general, se asume que mientras los estadios I o II hacen referencia a tumores localizados, de pequeño tamaño y sin afectación ganglionar, los estadios III y IV se consideran estadios avanzados, con afectación tumoral primaria extensa, que pueden invadir estructuras cercanas, con o sin afectación ganglionar de forma simultánea. Es importante mencionar que el última edición de esta clasificación, la denominación “resecable (T4a)” y “no resecable (T4b)” han sido suprimidas y cambiadas por los términos tumor avanzado (T4a) o tumor muy avanzado (T4b), debido al hecho de que en los tumores de cabeza y cuello es frecuente encontrar casos de tumores con estadios avanzados que aunque podrían ser resecables, finalmente completan un abordaje no quirúrgico, debido principalmente a la presencia de factores médicos que limitan la cirugía, o en casos en los que la extensión de la cirugía oncológica recomendada se asociaría a una significativa morbi-mortalidad. En este sentido, el concepto de no resecabilidad genera gran controversia entre la comunidad científica debido a la variabilidad entre centros y cirujanos. El cambio de terminología, ha redefinido las categorías de estadio IV en: moderadamente avanzado con enfermedad local o regional (estadio IVa), muy avanzado con enfermedad local o regional (estadio IVb) o enfermedad metastásica a distancia (estadio IVc), y por tanto, la definición como estadio IV, no determinaría per se, la incurabilidad de dicho tumor, especialmente en ausencia de enfermedad a distancia (41).

### 1.6.2.1 Estadificación de los tumores escamosos de orofaringe no relacionados con la infección por HPV.

<b>Estadio T Clínico y Patológico</b>	<b>Características</b>
Tx	Afectación primaria no valorable
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor $\leq$ 2cm
T2	Tumor > 2 cm pero <4 cm
T3	Tumor >4cm o extensión superficie lingual de epiglotis
T4	Enfermedad local moderadamente avanzada
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada, tumor invade laringe, músculo extrínseco lengua, pterigoideo medial, paladar duro o mandíbula
T4b	Enfermedad local muy avanzada, invadiendo musculo pterigoideo, lateral de nasofaringe, base de cráneo o engloba arteria carótida

<b>Estadio N Clínico</b>	<b>Características</b>
Nx	Afectación ganglionar no valorable
N0	Sin afectación ganglionar
N1	1 ganglio ipsilateral <3 cm, sin afectación extracapsular
N2	1 ganglio ipsilateral >3 cm, pero <6 cm, sin afectación extracapsular, o múltiples ganglios ipsilaterales <6 cm sin afectación extracapsular o afectación bilateral o contralateral <6 cm sin afectación extracapsular
N2a	1 ganglio ipsilateral >3 cm, pero <6 cm, sin afectación extracapsular
N2b	Múltiples ganglios ipsilaterales <6 cm sin afectación extracapsular
N2c	Afectación bilateral o contralateral <6 cm sin afectación extracapsular
N3	1 ganglio ipsilateral >6 cm, sin afectación extracapsular o cualquier ganglio con afectación extracapsular
N3a	1 ganglio ipsilateral >6 cm, sin afectación extracapsular
N3b	Cualquier ganglio con afectación extracapsular

### Estadio anatómico y pronóstico TNM

Categoría T	Categoría N			
	N0	N1	N2	N3
T0	I	III	IVA	IVB
T1	II	III	IVA	IVB
T2	III	III	IVA	IVB
T3	IVA	IVA	IVA	IVB
T4	IVB	IVB	IVB	IVB

\*cualquier M1 se considera estadio IVC

**Figura 3. Estadía TNM de tumores de orofaringe no relacionados con la infección por HPV (p16). AJCC Cancer Staging 2017.** Figuras adaptada de Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. AJCC Cancer Staging Manual, Eight Edition (2017) (68)

#### 1.6.2.2 Estadificación de los tumores escamosos de cavidad oral no relacionados con la infección por HPV.

Estadio T Clínico y Patológico	Características
Tx	Afectación primaria no valorable
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor $\leq 2$ cm con $\leq 5$ mm de invasión tumoral
T2	Tumor $\leq 2$ cm con $> 5$ mm de invasión tumoral y $\leq 10$ mm o Tumor $> 2$ cm pero $< 4$ cm con $< 10$ mm invasión tumoral
T3	Tumor $> 4$ cm o cualquier $> 10$ mm invasión tumoral
T4	Enfermedad local moderadamente o muy avanzada
T4a	Enfermedad local moderadamente avanzada, tumor invade cortical de hueso, nervio inferior alveolar, suelo de boca, piel de cara, estructuras adyacentes solo. Nota: erosión hueso superficial en tumor primario de encía no se considera T4
T4b	Enfermedad local muy avanzada, espacio masticador, músculo pterigoideo, lateral de nasofaringe, base de cráneo o engloba arteria carótida interna

Estadio N Clínico	Características
Nx	Afectación ganglionar no valorable
N0	Sin afectación ganglionar
N1	1 ganglio ipsilateral $\leq 3$ cm, sin afectación extracapsular
N2	1 ganglio ipsilateral $\leq 3$ cm, pero afectación extracapsular, $>3$ cm pero $>6$ cm sin afectación extracapsular o afectación múltiple ipsilateral $<6$ cm sin afectación extracapsular, o afectación bilateral o contralateral $<6$ cm sin afectación extracapsular
N2a	1 ganglio ipsilateral $\leq 3$ cm, pero afectación extracapsular, $>3$ cm pero $>6$ cm sin afectación extracapsular
N2b	Afectación múltiple ipsilateral $<6$ cm sin afectación extracapsular
N2c	Afectación bilateral o contralateral $<6$ cm sin afectación extracapsular
N3	1 ganglio ipsilateral $>6$ cm sin afectación extracapsular, o 1 ganglio ipsilateral $>3$ cm y afectación extracapsular o múltiples ipsilateral, contralateral o bilateral con y sin afectación extracapsular
N3a	1 ganglio ipsilateral $>6$ cm, sin afectación extracapsular
N3b	1 ganglio ipsilateral $>3$ cm y afectación extracapsular o múltiples ipsilateral, contralateral o bilateral con y sin afectación extracapsular

#### Estadio anatómico y pronóstico TNM

Categoría T	Categoría N			
	N0	N1	N2	N3
T1	I	III	IVA	IVB
T2	II	III	IVA	IVB
T3	III	III	IVA	IVB
T4a	IVA	IVA	IVA	IVB
T4b	IVB	IVB	IVB	IVB

\*cualquier M1 se considera estadio IVC

**Figura 4: Estadaje TNM de tumores de cavidad oral no relacionados con la infección por HPV (p16). AJCC Cancer Staging 2017.** Figuras adaptada de Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. AJCC Cancer Staging Manual, Eight Edition (2017) (68)



## ***1.7 Tratamiento de los tumores escamosos de cabeza y cuello localmente avanzados***

### **1.7.1 Tratamiento de los tumores escamosos de cabeza y cuello localmente avanzados y resecables**

#### **1.7.1.1 Cirugía**

Todos los pacientes afectados con tumores de cabeza y cuello, independientemente de la localización tumoral primaria, deben de ser evaluados por un cirujano oncológico especializado en dicha área antes de iniciar cualquier tipo de tratamiento, con la finalidad de evaluar las opciones de resecabilidad tumoral. En este sentido, resulta imprescindible definir de la forma más aproximada posible cual sería el abordaje y manejo tanto del tumor primario como de la afectación cervical, definir las posibilidades de resección completa tumoral con valoración de los márgenes anatómicos y valoración del manejo de los nervios craneales (VII, X, XII). Además, resulta crucial definir la posible reconstrucción que requeriría el paciente en función del abordaje quirúrgico que se considere. Como hemos mencionado, la definición de resecabilidad genera frecuente controversia, en la que influyen, además de factores propiamente tumorales, otros como: experiencia del equipo quirúrgico, las opciones de tratamiento de soporte que se puedan ofrecer, por ejemplo soporte por parte de cirujanos plásticos, etc. Asimismo, se debe de llevar a cabo una valoración completa del estado general del paciente, que incluya aspectos nutricionales, comorbilidades, preferencias terapéuticas del paciente, etc. Es importante remarcar que la extensión del abordaje quirúrgico no debe variar en función de la posible respuesta a terapias realizadas previas a la cirugía, excepto en el contexto de progresión tumoral que requiera una cirugía más extensa de la inicialmente prevista. Todas estas valoraciones se deben llevar de forma multidisciplinar, dado el manejo complejo de estos tumores y la importante comorbilidad asociada a los tratamientos (41). En general, se consideran tumores irresecables aquellos en los que el cirujano considera que no es posible conseguir la resección tumoral completa, o si la cirugía prevista implicara el uso de radioterapia complementaria en la que presuponga un pobre control locoregional. Así, se considera que tumores con afectación de vértebras cervicales, base de cráneo, área nasofaríngea

superior, plexo braquial, músculos profundos del cuello, músculos pterigoideos, normalmente asociados a un trismus importante, o la arteria carótida, se considerarían a irresecables. Además, la existencia de factores mal pronóstico como, afectación de piel, mediastino, fascia prevertebral o cuerpo vertebral cervical también contraindicaría la resecabilidad (41).

Respecto a la consecución de unos márgenes tumorales “óptimos”, se considera que el objetivo oncológico sería la resección en bloque tumoral, con confirmación histológica sin evidencia microscópica de afectación de márgenes, ya que este hecho se asocia a una disminución importante del riesgo de recurrencia tumoral. La distancia que se consideraría apropiada varía en función de la locación tumoral, así en tumores de glotis los márgenes de 1-2 mm se considerarían óptimos, mientras que en otras localizaciones se requeriría  $> 5$  mm (41). Es importante diferenciar entre los tumores irresecables, aquellos tumores que aun considerándose potencialmente resecables, se asociarían a una comorbilidad inaceptable para el paciente, de los tumores inoperables, que se consideran aquellos que, aun siendo resecables, la cirugía no puede llevarse debido a comorbilidades del paciente o es el propio paciente quien rechaza la cirugía. En este sentido, los pacientes con tumores potencialmente resecables, pero que no desean realizar cirugía, representan un grupo frecuente entre los tumores de cabeza y cuello.

Además del abordaje tumoral primario, la realización de una linfadenectomía cervical requiere de una valoración cuidadosa que implica una minuciosa exploración física así como la realización de pruebas de estadiaje radiológico y/o confirmación citológica. En general se considera que el manejo de la afectación cervical viene determinado por la extensión y localización del tumor primario, y aunque la linfadenectomía cervical ipsilateral es el procedimiento más habitual, en casos de tumores primarios clásicamente asociados con afectación ganglionar bilateral o próximos a la línea media, como son los tumores de base de lengua, paladar, laringe supraglótica, se debería contemplar la linfadenectomía bilateral. De forma tradicional, la linfadenectomía, se ha clasificado como linfadenectomía radical o radical modificada, aquella que se asociada a preservación del musculo esternocleidomastoideo, la vena yugular, el nervio espinal accesorio, y determinados ganglios linfáticos. Actualmente, la nomenclatura contemporánea define como linfadenectomía comprensiva o selectiva. La

linfadenectomía comprensiva, habitualmente recomendada para la afectación N3, hace referencia a la resección de todos los ganglios linfáticos, que serían incluidos en la clásica linfadenectomía radical, de forma independiente de la conservación del musculo esternocleidomastoideo, vena yugular o nervio espinal accesorio (69). La linfadenectomía selectiva, se basa en el riesgo de afectación microscópica oculta asociada a cada localización tumoral primaria y sus vías de irrigación (70, 71). Así, en tumores de cavidad oral, la afectación tumoral en profundidad se considera un factor de riesgo de metástasis oculta, por lo que este factor es utilizado habitualmente en la toma de decisiones referentes al tipo de linfadenctomía a completar. En tumores de > 4 mm de invasión en profundidad, se recomienda la linfadenectomía selectiva, si no se puede realizar radioterapia complementaria, siendo su indicación dudosa en tumores <2 mm (41). Una linfadenectomía selectiva en pacientes con tumores de cavidad oral sin afectación clínica ganglionar (N0), debería de incluir los niveles I-III, mientras que si el tumor primario es faríngeo o laríngeo, la linfadenectomía selectiva debería incluir niveles II-IV y nivel IV en tumores laríngeos infraglóticos) (72). En los tumores de cavidad oral con estadios iniciales sin evidencia clínica de afectación ganglionar, es cuestionable el beneficio de la realización de linfadenectomía, ya que la afectación ganglionar fuera del nivel cervical que le correspondería es muy infrecuente (<10%) y por tanto la linfadenectomía selectiva se plantearía en pacientes con N1 o N2 (73, 74). Sin embargo, un metaanálisis reciente ha sugerido como la linfadenectomía selectiva se podría asociar con una disminución de riesgo de mortalidad específica en tumores de cavidad oral, N0, comparado con pacientes que únicamente completaron observación (riesgo relativo RR, 0.57;95% CI,0.36-0.89;p=0.014) (75). Por último, el uso del ganglio centinela, siempre y cuando sea realizado en centros especializados, se puede considerar una opción válida para diagnosticar metástasis cervicales ocultas, evitando la realización de linfadenectomías cervicales radicales , disminuyendo por tanto la significativa morbilidad asociada a estos procedimientos (76-80).

Aunque habitualmente las cirugías de los tumores de cabeza y cuello son extensas, es importante mencionar el papel de la cirugía mínimamente invasiva, vía robótica, como alternativa en determinados casos de tumores de cavidad oral y orofaríngeo. Esta técnica, se asocia a una disminución de la morbilidad quirúrgica, y su uso ha aumentado de forma considerable en países como Estados Unidos (81-84). El beneficio funcional, como en calidad de vida, asociado a esta técnica se consigue tanto

en pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos como negativos (85), asociándose a unos resultados oncológico óptimos, particularmente en los pacientes en los que es capaz de conseguir márgenes libres, siendo la tasa de control locoregional superior al 90% (86). Además, se ha reportado como entre el 9-27% de los pacientes tratados con cirugía robótica pueden no requerir tratamiento complementario de radioterapia, y hasta un 35-45% no requerirían quimioterapia (87). Estos prometedores beneficios han llevado al desarrollo de estudios clínicos que evalúan el papel de la cirugía robótica comparada con el tratamiento estándar de radioterapia o quimioradioterapia en el subgrupo de pacientes de mejor pronóstico, incluidos pacientes con tumores HPV positivos.

En tumores de cavidad oral, el abordaje multidisciplinar es particular importante, dada la alta tasa de recurrencia de estos tumores y las importantes implicaciones funcionales como estéticas asociadas a esta localización tumoral. Así un correcto abordaje requiere diseñar la forma más óptima de preservar funciones fisiológicas como son la masticación, deglución o la articulación del habla (88). En particular, para los tumores cavidad oral localmente avanzados, la cirugía, siempre y cuando sea posible de realizar de forma óptima y con márgenes libres, se considera habitualmente como el tratamiento de elección (89). En caso de afectación de márgenes, es frecuente valorar la re-intervención, y de no ser posible, o la extensión de la cirugía requiriera de cirugías agresivas como glosectomías, o maxilectomías, el tratamiento complementario de radioterapia o quimioradioterapia sería la opción a valorar. Por tanto, y dado el papel predominante de la cirugía en tumores de cavidad oral, el uso de quimioradioterapia concomitante como opción de preservación de órgano, es menos común que en otras localizaciones tumorales. Además, diferentes características específicas de los tumores de cavidad oral favorecen o determinan el papel predominante de la cirugía. Así, los tumores de labio son frecuentemente diagnosticados en estadíos iniciales, al ser tumores visibles y sintomáticos precozmente(90), e incluso en ocasiones la radioterapia podría considerarse opción alternativa a la cirugía, si ésta se asocia a una importante morbilidad (91). Los tumores de suelo de boca, a pesar de que suelen presentar afectación mandibular y ganglionar cervical, acostumbran a ser resecaados con márgenes tumorales negativos muy amplios (92). En cuanto a los tumores de lengua oral, tumores más frecuentes de cavidad oral y asociados habitualmente a peor pronóstico que el resto de localizaciones (93-95), suelen requerir cirugías agresivas, como glosectomías

parciales, llegando a requerir glossectomías totales en casos de afectación de vasos bilateral. En estos casos, se requeriría además una laringectomía y posterior valoración de radioterapia complementaria, por lo que el tratamiento concomitante de quimioradioterapia o tratamiento secuencial se podrían indicar en esta situación. A su vez, el abordaje de los tumores de trigono retromolar y cresta alveolar vendrá determinado en parte por la afectación dental, ya que en aquellos tumores bien delimitados se podrían plantear cirugía que puede llegar a ser realizada incluso por vía transoral. En otros casos de mayor extensión, pueden llegar a necesitar la realización de mandibulectomías segmentarias, que habitualmente requerirán tratamiento complementario (96, 97). Respecto a los tumores de paladar duro, considerados infrecuentes, la cirugía es el tratamiento prioritario en la mayoría de los casos seleccionados (98). Por último, los tumores de mucosa bucal, frecuentemente asociados a una alta tasa de recurrencias locales, y por tanto peor pronóstico que otras localizaciones (99), la cirugía primaria también se considera el tratamiento de elección, pudiendo ser la radioterapia radical otra alternativa.

### **1.7.1.2 Radioterapia**

El tratamiento con radioterapia radical suele ser ofrecido a pacientes seleccionados, con condiciones médicas que dificultan su intervención, o para aquellos pacientes que rechazan la cirugía (41). Sin embargo, un número limitado de estudios ha comparado cirugía con radioterapia en este contexto (100). Respecto al tipo y esquema de tratamientos de radioterapia en monoterapia que se consideraría estándar en esta situación se han considerado diferentes opciones de fraccionamientos de tratamiento administrados sobre tumor primario, ganglios y áreas de riesgo de posible afectación subclínica:

- Dosis de 66 Gy (2.2 Gy/fracción) – 70 Gy (2.0 Gy/fracción durante 5 días durante 6-7 semanas.
- Fraccionamiento acelerado de 66-70 Gy (2.0 Gy/fracción; 6 fracciones por semana)
- Administración de “boost” con radioterapia acelerada: 72 Gy/6 semanas.
- Hiperfraccionamiento: 81.6 Gy/7 semanas (1.2 Gy fracción/2 veces al día).

- Sobre zonas de riesgo intermedio, dosis de 44-50 Gy (2 Gy/fracción) o 54-63 Gy (1.6-1.8 Gy/fracción) se considerarían apropiadas.

La radioterapia paliativa, sin intención radical, se puede plantear en pacientes sin opción quirúrgica óptima o con deterioro general asociado (41).

### **1.7.1.3 Radioterapia y Quimioterapia adyuvante**

Para los pacientes con tumores de cabeza y cuello localmente avanzados, en los que se ha completado una cirugía oncológica primaria, las opciones de tratamiento adyuvante contempladas variarán desde la observación, al tratamiento de radioterapia y el tratamiento concomitante de radioterapia y quimioterapia. De forma global las indicaciones para completar tratamiento complementario serían en casos con tumores de alto riesgo de recurrencia, definidos como afectación ganglionar con afectación extracapsular y afectación de márgenes quirúrgicos (77, 101, 102). En la actualidad existe controversia respecto al tratamiento complementario a la radioterapia para pacientes de riesgo intermedio de recurrencia (presencia de invasión perineural, invasión linfovascular, márgenes quirúrgicos cercanos, afectación múltiple ganglionar >6 cm sin afectación extracapsular, o afectación ganglionar única > 3 cm, o tumores primarios extensos (estadios T3-T4), en los que se podría plantear tratamiento de radioterapia en monoterapia o combinado con quimioterapia. En este subgrupo, los datos del beneficio global de la adición de quimioterapia a la cirugía en comparación con radioterapia en monoterapia, fueron reportados en el metaanálisis MACH-NC, sin observar un beneficio estadísticamente significativo en SG con la adición de quimioterapia, en los 6 estudios y 2567 pacientes incluidos en este subanálisis (HR 1.06, 95% CI 0.95-1.16) (103, 104). Es importante remarcar que en el caso de pacientes con márgenes afectos, la reintervención con ampliación de márgenes, cuando técnicamente es posible, o en última instancia el tratamiento de radioterapia complementaria serían las opciones a considerar (77, 101, 102, 105, 106). En tumores de cavidad oral, un estudio fase III realizado en India ha valorado el beneficio de radioterapia y/o quimioterapia en 900 pacientes afectos de tumores localmente avanzados de cavidad oral. En este estudio, los pacientes eran randomizados a radioterapia sola (60 Gy en 30 fracciones en 6 semanas) o radioterapia acelerada (60

Gy en 30 fracciones en 5 semanas) o radioterapia (60 Gy en 30 fracciones en 6 semanas) concomitante con quimioterapia (cisplatino 30mg/m<sup>2</sup> semanal). Aunque en el global de la población no se objetivaron diferencias significativas en beneficio en control locoregional o SG, los pacientes de alto riesgo (T3-T4, N2/N3, afectación extracapsular) tratados con quimioradioterapia obtuvieron un beneficio significativo(107). Respecto al intervalo de los tratamientos complementarios, se recomienda iniciar el tratamiento de radioterapia antes de las 6 semanas desde la cirugía, utilizando como esquema de radioterapia las siguientes opciones sobre tumor primario, ganglios y áreas de riesgo de posible afectación subclínica:

- Dosis de 60-76 Gy (2.0 Gy/fracción durante 5 días durante 6-7 semanas
- Sobre zonas de riesgo intermedio, dosis de 44-50 Gy (2 Gy/fracción) o 54-63 Gy (1.6-1.8 Gy/fracción) se considerarían apropiadas (41).

## **1.7.2 Tratamiento de los tumores escamosos de cabeza y cuello localmente avanzados e irresecables: Estrategias de preservación de órgano**

### **1.7.2.1 Quimioradioterapia concomitante**

En determinadas ocasiones la resecabilidad de los tumores localmente avanzados no se puede conseguir de forma óptima, o en otros casos, a pesar de ser considerados potencialmente resecables con cirugía primaria, esta cirugía se asociaría a una elevada comorbilidad funcional y/o estética. En estos casos, el tratamiento requiere de un abordaje multidisciplinar que incluye a cirujanos, radioterapeutas, oncólogos médicos y nutricionistas, con el objetivo de conseguir un abordaje no quirúrgico, óptimo desde el punto de vista oncológico y que permitía la preservación de órgano (108). Diferentes factores, entre los que se incluyen, la localización del tumor primario, estadio tumoral, características del paciente, edad y comorbilidades, influyen de manera relevante en la estrategia de tratamiento a seguir, siendo tanto la localización, como ocurre en los tumores de hipofaringe habitualmente asociados a peor pronóstico, como el estadio tumoral, los factores más relevantes a tener en cuenta (109, 110). Además, la edad y el estado general del paciente (performance estatus) se han identificados como

factores predictivos de respuesta a los tratamientos de quimioterapia y radioterapia en diferentes estudios clínicos randomizados y metaanálisis (103).

En los casos en que se opta por un abordaje con finalidad de preservación de órgano, de forma general se considera que el beneficio en SG es similar al obtenido con el tratamiento de cirugía y radioterapia (103, 104). Se han desarrollado diferentes estrategias terapéuticas como preservación de órgano.

- Tratamiento concomitante radical:
  - Quimioradioterapia
  - Terapia anti-EGFR y Radioterapia
  
- Inducción: Quimioterapia de inducción seguido de tratamiento radical, que puede variar entre radioterapia en monoterapia, quimioradioterapia o tratamiento con terapias dirigidas y radioterapia (111-113).

En general, en el caso de los tumores de cabeza y cuello localmente avanzados, tanto resecables pero en los que no se puede llevar a cabo la cirugía por diferentes motivos, como en los casos claramente irresecables, diferentes estudios y metaanálisis han confirmado la superioridad del tratamiento combinado y concomitante de quimioradioterapia respecto a radioterapia en monoterapia. Dicho beneficio representa entre un 5-9% en beneficio absoluto en SG a los 5 años (103), siendo incluso mayor para los pacientes con tumores de cavidad oral y orofaringe (114). En este metaanálisis incluía datos de 93 estudios y 16485 pacientes con tumores localmente avanzados resecables e irresecables, en los que todos eran randomizados a realizar terapia locoregional (cirugía y/o radioterapia) o tratamiento definitivo con la combinación de quimioradioterapia (adyuvante, concomitante o inducción). En estos estudios, se incluyeron pacientes con tumores de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe y el objetivo primario del metaanálisis era SG. Sobre el total de estudios incluidos, el tratamiento concomitante de quimioradioterapia se pudo analizar en 50 estudios con 9605 pacientes incluidos. En este subgrupo, el tratamiento concomitante demostró un beneficio en SG del 6.5% a los 5 años (HR 0.81, 95% CI 0.78-0.86), asociándose a una disminución de la mortalidad específica por cáncer, sin aumento en la mortalidad no



relacionada con cáncer. Es importante remarcar que no se sugirió ninguna diferencia significativa entre los diferentes regímenes de tratamiento de radioterapia (103).

A pesar del beneficio observado mediante el tratamiento concomitante, el régimen óptimo de este tratamiento ha generado controversia. El metaanálisis MACH-NC demostró un mayor beneficio con las quimioterapias basadas en platino comparado con otros regímenes, sin embargo, en este grupo de estudios, pocos analizaban una comparación directa entre regímenes, e incluso muchos de los estudios no eran randomizados ni estaban potenciados para demostrar diferencias estadísticamente significativas. El tratamiento habitualmente administrado consiste en el uso de Cisplatino a altas dosis (100 mg/m<sup>2</sup> días 1, 22, y 43), sin embargo este tratamiento se asocia a importantes toxicidades agudas y tardías (103, 115). Así, en diferentes estudios, como el RTOG 91-11, que evaluaba el tratamiento concomitante en pacientes con tumores laríngeos localmente avanzados, se ha demostrado la alta frecuencia de efectos secundarios grados 3 y 4, principalmente en forma de toxicidad hematológica, mucositis, disfagia o náusea/vómitos de hasta un 47, 43, 35 y 20% respectivamente (116). Es importante remarcar el hecho de como las toxicidades secundarias pueden llegar a limitar de forma significativa la adherencia al tratamiento, hasta el punto de que únicamente el 70% de los pacientes pueden llegar a completar los 3 ciclos de tratamiento concomitante con cisplatino establecidos por protocolo. Por tanto, este tipo de tratamiento se reserva para pacientes muy seleccionados, con estado general óptimo. También se ha generado controversia respecto al número óptimo de ciclos de tratamiento concomitante. En el mismo estudio RTOG 91-11, el fraccionamiento de radioterapia, una vez al día durante 7 semanas de tratamiento, en combinación con 3 ciclos de cisplatino a altas dosis, se comparó con el tratamiento de radioterapia acelerada con sobreimpresión (42 fracciones administradas en 6 semanas) con 2 ciclos de cisplatino a altas dosis. Aunque el número de pacientes que recibieron dos ciclos de tratamiento era limitado, haciendo difícil la comparación, no se objetivaron diferencias estadísticamente significativas en SG entre ambas estrategias. De forma paralela, este estudio demostró como los pacientes que únicamente completaron 1 ciclo de quimioterapia obtuvieron peores resultados. También se ha observado, según los datos del metaanálisis, como el beneficio del tratamiento concomitante es dependiente de la edad, perdiendo el beneficio en pacientes mayores de 70 años (103, 106). Dada la elevada toxicidad asociada, diferentes regímenes de cisplatino, como cisplatino semanal

a dosis de 30-40 mg/m<sup>2</sup> (117-121), o sustituir el cisplatino por el carboplatino, tanto trisemanal como semanal, se han valorado como opciones de tratamiento alternativas. Sin embargo, algunos estudios han sugerido menor eficacia del carboplatino respecto al cisplatino, lo que podría estar en relación al menor poder radiosensibilizador del carboplatino, que además se asocia a un perfil de toxicidad diferente, con mayor toxicidad hematológica, pero menor nefrotoxicidad, vómitos o neurotoxicidad (122, 123).

Al igual que ocurre con la elección del esquema óptimo de quimioterapia, el esquema de radioterapia concomitante con quimioterapia basada en cisplatino 100 mg/m<sup>2</sup>, también ha sido extensamente estudiado. De forma global se recomienda una dosis de 70 Gy (2.0 Gy/fracción durante 7 semanas) sobre la zona de alto riesgo y 44-50 Gy (2.0 Gy/fracción) hasta 54-63 Gy (1.6-1.8 Gy/fracción (124), prefiriéndose el uso de técnicas de IMRT en pacientes con tumores de orofaringe, disminuyendo por tanto los efectos secundarios a largo plazo, en un grupo con a priori mejor pronóstico que otras localizaciones, en las que el uso de IMRT está aún en desarrollo. Además, el hiperfraccionamiento ha demostrado mayor beneficio en control locoregional y SG que la radioterapia estándar administrada una vez al día en monoterapia (125). Asimismo, el fraccionamiento acelerado, proporcionando administraciones continuas sin reducción de dosis, también se asociada a mejor control local, aunque el beneficio en SG respecto al fraccionamiento estándar no está claramente establecido. A pesar del beneficio sugerido por las nuevas técnicas, éstas se asocian a altos costes y requieren una gran especialización, lo que limita su uso. A pesar del beneficio observado con las nuevas técnicas de radioterapia comparado con el tratamiento estándar, este beneficio se limita cuando se administra de forma concomitante con quimioterapia. Así, el hiperfraccionamiento, administrado de forma concomitante con la quimioterapia no ha demostrado beneficio respecto al tratamiento estándar en al menos dos estudios randomizados, e incluso se ha sugerido que el fraccionamiento estándar sería superior en términos de eficacia. El estudio RTOG 0129, en el que 721 pacientes con tumores localmente avanzados eran randomizados a radioterapia estándar (fraccionamiento diario, 70 Gy en 35 fracciones durante 7 semanas) o fraccionamiento acelerado (70 Gy en 42 fracciones durante 6 semanas) en combinación con altas dosis de cisplatino días 1,22 y 43 para el brazo de radioterapia estándar o cisplatino días 1 y 22 para el fraccionamiento acelerado, no demostró diferencias en SG a los 8 años (48% para

ambos esquemas, HR 0.96, , 95% CI 0.79-1.18), sin encontrar tampoco diferencias en SLP o control locoregional (126). En el estudio GORTEC 99-02, 840 pacientes fueron randomizados a uno de los siguientes 3 regímenes: quimiorradioterapia convencional (70 Gy en 7 semanas y 3 ciclos de carboplatino/fluoracilo), fraccionamiento acelerado concomitante con quimioterapia (70 Gy en 6 semanas y 2 ciclos de carboplatino/fluorouracilo) o fraccionamiento acelerado en monoterapia (64.8 Gy en 3.5 semanas) (127). En este estudio, con un seguimiento de 5 años, no se observó beneficio en SG o SLP para la radioterapia acelerada (SLP a los 3 años 34 versus 38%,  $p = 0.88$ ). De forma general se recomienda para los tratamientos de radioterapia el uso de tecnologías novedosas como la radioterapia de intensidad modulada, cuando sea posible, permitiendo ajustes del campo y volúmenes de tratamiento durante el curso de la radioterapia, permitiendo limitar la toxicidad asociada a órganos sanos adyacentes, así como a glándulas salivares, lo que disminuiría la xerostomía y disfagia asociadas al tratamiento.

### **1.7.2.2 Tratamiento Anti-EGFR concomitante con Radioterapia**

El factor del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR) está altamente sobreexpresado en tumores escamosos de cabeza y cuello y se asocia con peor pronóstico (128, 129). La activación de EGFR facilita el crecimiento tumoral y favorece la proliferación celular, la angiogénesis, y la capacidad de metastatización de las células tumorales (130). Diferentes fármacos anti-EGFR han sido desarrollados para el tratamiento de los tumores de cabeza y cuello, incluyendo anticuerpos monoclonales anti-EGFR como cetuximab y panitumumab, o inhibidores tirosinaquinasas como erlotinib.

Cetuximab es el fármaco anti-EGFR más ampliamente desarrollado y más eficaz para el tratamiento de los tumores de cabeza y cuello, demostrando, de forma concomitante con radioterapia, beneficio en tasa de respuestas, SLP y SG comparado con radioterapia en monoterapia (111). En este estudio internacional, 424 pacientes con tumores localmente avanzados de orofaringe, hipofaringe y laringe, fueron randomizados a recibir radioterapia o radioterapia concomitante con cetuximab semanal, administrado a dosis de 400 mg/m<sup>2</sup> durante la primera semana seguido de

cetuximab a dosis de 250 mg/m<sup>2</sup> semanal durante la duración de la radioterapia. En este estudio el tratamiento concomitante demostró un beneficio significativo en SG a los 3 años, pasando de 45% a 55% (HR 0.73). Además, también mejoró el control locoregional (50 vs 41%). Un subanálisis de este estudio, también ha sugerido que el beneficio de la combinación se restringe a pacientes <65 años, performance status de 0-1 y pacientes con tumores de orofaringe. En este estudio los pacientes >65 años o performance status de 2, no se beneficiaban del tratamiento combinado e incluso presentaban mejor SG con radioterapia en monoterapia. Sin embargo, el tratamiento concomitante con cetuximab no está exento de efectos secundarios, que pueden ser potencialmente significativos como es el caso de la dermatitis grados 3 y 4 (114). Es importante remarcar que este estudio comparaba el tratamiento concomitante con la radioterapia en monoterapia, por tanto no responde a la pregunta de si el tratamiento con cetuximab puede sustituir al tratamiento concomitante estándar basado en platino. Por tanto, en la actualidad, y fuera de estudio clínico, cetuximab administrado de forma concomitante con radioterapia se considera una opción válida para aquellos pacientes que no son candidatos a completar tratamiento con quimioterapia basada en cisplatino, como por ejemplo, pacientes con comorbilidades importantes (131).

En la actualidad, los resultados definitivos de diversos estudios que han comparado de forma directa las dos estrategias terapéuticas de concomitancia, la basada en platino y radioterapia o cetuximab y radioterapia, están pendientes de ser reportados. Resultados preliminares del estudio fase II TREMPLIN, el cual evaluaba la tasa de preservación laríngea en pacientes con tumores laríngeos o de hipofaringe tratados con quimioterapia de inducción y posterior concomitancia con cisplatino o cetuximab y radioterapia han sido reportados (132). En dicho estudio, aunque los pacientes tratados con cetuximab presentaron mayor tasa de toxicidad cutánea en el campo de radioterapia, la tasa de complicaciones severas fue significativamente inferior conllevando de forma global un mejor cumplimiento del protocolo de tratamiento. En cuanto a control locoregional a los 18 meses, objetivo primario del estudio, se observó un beneficio no estadísticamente significativo en aquellos pacientes tratados con cetuximab. Tampoco se detectaron diferencias significativas en la proporción de recurrencias metastásicas entre ambos brazos de tratamiento. Otro estudio fase II que comparaba cetuximab y radioterapia con el tratamiento de cisplatino semanal y radioterapia sugirió que el tratamiento con cetuximab presentaba tasas elevadas de toxicidad aguda (cutánea y

mucositis) que dificultan la adherencia al tratamiento, acompañado de una tendencia a peor SG (133). Otros estudios, como el estudio fase III RTOG 0522, han evaluado la eficacia de la combinación de cetuximab, cisplatino y radioterapia, sin objetivar impacto en SLP o SG para la triple combinación (134). Por tanto, el uso de cetuximab y radioterapia como alternativa de radioterapia en monoterapia en pacientes añosos no se considera un tratamiento estándar, pudiendo ser estos pacientes tratados con radioterapia radical o con fraccionamiento alterado. En este sentido, un metaanálisis ha demostrado beneficios en control locoregional y SG con radioterapia con fraccionamiento alterado en comparación con el estándar (3.4% mejoría en SG a los 5 años en la combinación de fraccionamientos acelerados e hiperfraccionados, y un 8% para los estudios de hiperfraccionamiento) (125).

Otros estudios que han evaluado la eficacia de diferentes anticuerpos monoclonales como panitumumab, en combinación con quimioterapia o con radioterapia no han demostrado beneficio en cuanto SLP o SG, y sí un aumento en la toxicidad reportada (135-137). Erlotinib, inhibidor tirosinaquinasa de EGFR en combinación con cisplatino tampoco ha demostrado beneficio en SLP o SG en pacientes con tumores localmente avanzados de cabeza y cuello (138).

### **1.7.2.3 Quimioterapia de inducción**

La quimioterapia de inducción ha demostrado ser una estrategia terapéutica eficaz para el tratamiento de los tumores de cabeza y cuello localmente avanzados e irresecables, como estrategia de preservación de órgano. Diferentes factores favorecen el racional de la realización del tratamiento de inducción como preservación de órgano. Por un lado, se ha demostrado un beneficio de la quimioradioterapia sobre la radioterapia en monoterapia, sugiriéndose que la inducción con quimioterapia es capaz de reducir de forma significativa el volumen tumoral y mejorar el estado general del paciente, lo que a su vez, permitiría realizar un tratamiento más efectivo y menos tóxico. Sin embargo es importante remarcar, que el volumen de tumor a radiar deber basarse siempre en la afectación tumoral pretratamiento. También, como posible racional para el uso del tratamiento de inducción se ha sugerido que éste sería beneficioso para tratar la afectación subclínica metastásica a distancia, y por otro lado,

al mejorar el control locoregional impactaría positivamente en la sensibilización del tumor a la radioterapia radical subsecuente. Además, el tratamiento con inducción puede aportar información pronóstica a la hora de seleccionar a los pacientes que pudieran o no, realizar tratamiento subsecuente con quimioradioterapia (41). A pesar de este racional, el tratamiento concomitante de quimioradioterapia suele ser de elección en la actualidad, basándonos en los datos del metaanálisis (103, 104) y en el hecho de la elevada toxicidad asociada a la quimioterapia de inducción y el posterior tratamiento radical con radioterapia y/o quimioterapia, lo cual limita de forma significativa la finalización del tratamiento de forma correcta, o incluso limita las opciones de radicalidad. Además, en determinados casos, como en tumores de laringe localmente avanzados con destrucción de órgano asociada, la cirugía sería el tratamiento preferible. Por todo ello, en la actualidad la estrategia óptima de integración de la quimioradioterapia, y el papel del tratamiento de inducción es controvertida.

Los resultados del importante metaanálisis demostraron como la magnitud de beneficio en SG y control locoregional conseguido con el tratamiento concomitante de quimioradioterapia, aunque no estadísticamente significativo (HR 0.90,  $p = 0.15$ ), es superior al obtenido mediante quimioterapia de inducción (103, 104). Sin embargo, en este metaanálisis, únicamente 6 estudios con 861 pacientes, comparaban directamente las dos estrategias, concomitancia o inducción. Esto es debido a que la mayoría de los estudios publicados entre los años 1980-1990 valoraban la estrategia de quimioterapia de inducción seguido de tratamiento radical basado en radioterapia y/o cirugía como abordaje de preservación laríngea. Además, es importante remarcar que este metaanálisis fue reportado en 2009, y por lo tanto no incluía los estudios modernos basados en la combinación de triple terapia, basada en taxanos, como terapia de inducción, ni tampoco incluía los estudios que valoraban la estrategia de quimioterapia de inducción seguida de quimio-radioterapia concomitante (únicamente incluida los estudios en los que la inducción era seguida de tratamiento con radioterapia radical). En este metaanálisis, en el que 31 estudios con 5311 pacientes analizaban la eficacia de la quimioterapia de inducción, no se observó diferencias en SG entre el tratamiento con inducción comparado con el tratamiento radical de cirugía y/o radioterapia (HR 0.96, 95% CI 0.90-1.02). Sin embargo, cuando los resultados se analizaban en función del régimen de quimioterapia, la SG con el régimen de cisplatino y fluoracilo era significativamente mejor que la obtenida con cirugía y/o radioterapia (HR 0.90, 95% CI 0.82-0.99) (103, 104). Los estudios iniciales de quimioterapia de inducción,

demonstraron como el tratamiento combinado de quimioterapia basada en cisplatino y fluoracilo (PF) administrados cada 3 semanas como quimioterapia de inducción aportaba un beneficio en SG y tasa de respuestas comparados con regímenes de cisplatino y bleomicina (139). Además, estos estudios demostraron como dicho régimen de quimioterapia de inducción (cisplatino/fluoracilo) seguido de radioterapia como tratamiento radical podía ser una alternativa al tratamiento hasta la fecha estándar de laringectomía total seguido de radioterapia adyuvante (112, 140). Sin embargo a pesar de estos resultados, los resultados del metaanálisis (103, 104), confirmando el beneficio en SG y control locoregional para el tratamiento concomitante de quimioradioterapia puso en duda la indicación de la quimioterapia de inducción. Posteriormente, el estudio del intergrupo 91-11 (141) en el que se comparaban 3 estrategias de preservación laríngea, radioterapia, quimioradioterapia basada en cisplatino y quimioterapia de inducción (cisplatino/fluoracilo) seguido de radioterapia, demostró una mayor tasa de preservación laríngea para el tratamiento concomitante, aunque la SG no difirió entre los brazos de tratamiento. Finalmente, dado que el beneficio en control locoregional aportado por el tratamiento concomitante es en base a un aumento en toxicidad, asociado con un limitado control de la enfermedad a distancia, se facilitó el desarrollo posterior de la quimioterapia de inducción, pero añadiendo los taxanos al régimen estándar. En este sentido, dos estudios randomizados fases III han demostrado como la adición de taxanos al doblete de quimioterapia basada en cisplatino y fluoracilo (TPF), era superior en cuanto a tasa de respuestas, SLP y SG a la quimioterapia basada en PF, en pacientes con tumores localmente avanzados de cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y laringe. Es importante remarcar que en estos estudios el tratamiento de inducción era seguido por radioterapia en monoterapia (EORTC 24971/TAX323) (142) o por la combinación de carboplatino semanal y radioterapia (TAX 324) (143), por lo que ninguno de los estudios valoró la eficacia y seguridad de la combinación de cisplatino y radioterapia tras tratamiento de inducción. En el estudio TAX 324, se objetivo una tasa de SG a los 5 años del 52% con la triple terapia comparado con 42% con PF (HR 0.74, 95% CI 0.58-0.94), sin embargo la toxicidad aguda observada fue significativa, principalmente en forma de toxicidad hematológica, con neutropenias g3-4 y fiebre neutropénica reportadas en un 83 y 12% respectivamente. Otras toxicidades no hematológicas, como mucositis, náuseas y anorexia, se asociaron frecuentemente a retrasos en la administración del tratamiento (29%). En el estudio, en el que 358 pacientes eran randomizados a 4 ciclos de quimioterapia de inducción basada en TPF o

PF, seguido de radioterapia en monoterapia, la SG observada también fue significativamente superior para el brazo de TPF (18.8 versus 14.5 meses de media).

Durante los últimos años, varios estudios han comparado la eficacia y tolerabilidad de la quimioterapia de inducción basada en taxanos, seguido del tratamiento concomitante estándar de quimioradioterapia, comparado con el tratamiento de quimioradioterapia. Un estudio español que incorporaba el tratamiento concomitante radical combinado con cisplatino y radioterapia como brazo control (7 semanas de radioterapia y cisplatino días 1,22,y 43) en comparación con dos regímenes de quimioterapia de inducción (TPF y platino-fluoracilo (PF)) seguidos del mismo tratamiento concomitante, sugirió como el beneficio en tiempo hasta la progresión con la terapia de inducción, sin observar diferencias en SG, se asociaba a una importante toxicidad secundaria ya que solo el 50% de los pacientes pudo completar el tratamiento por protocolo (144). Tampoco otros estudios fase III como el DeCIDE (145) y PARADIGM (146) han demostrado beneficio en SG o SLP para la estrategias de quimioradioterapia tras realización de quimioterapia de inducción. En este estudio, en el estudio DeCIDE, 280 pacientes con tumores de cabeza y cuello y afectación ganglionar N2 o N3 eran randomizados a completar tratamiento con 2 ciclos de quimioterapia de inducción basada en TPF seguido de quimioradioterapia (docetaxel, fluoracilo e hidroxiurea durante 5 ciclos y radioterapia con fraccionamiento de 1.5 Gy dos veces al día cada 2 semanas) o quimioterapia en monoterapia, sin encontrar diferencias significativas en SG (HR 0.91, 95% CI 0.59-1.41) (145). De forma paralela, la estrategia de quimioterapia de inducción también ha sido analizada en tumores de laringe, en el estudio francés TREMLIN. Este estudio reportó una alta tasa de modificación de dosis durante la fase de inducción y una tasa limitada de cumplimiento terapéutico durante la fase de concomitancia (132). Finalmente, un metaanálisis con un total de 1772 pacientes incluidos en 5 estudios que han evaluado la eficacia de la quimioterapia de inducción basada en taxanos, ha demostrado tanto una reducción del riesgo de muerte con la adición de taxanos (SG 42 vs 35% a los 5 años, HR 0.79, 95% CI 0.70-0.89), como de recurrencia locoregional a los 5 años (44 vs 52%, HR 0.79, 95% CI 0.66-0.94) (147).

Por último, con el objetivo de disminuir la toxicidad secundaria, diferentes estudios randomizados han valorado el papel de la concomitancia con radioterapia y



cetuximab tras el tratamiento de quimioterapia de inducción. En un estudio italiano fase II/III, un total de 421 pacientes con tumores localmente avanzados fueron randomizados a recibir tratamiento de inducción basado en 3 ciclos de TPF seguido de quimiorradioterapia o tratamiento concomitante con quimiorradioterapia. Dentro de cada grupo de tratamiento, los pacientes eran posteriormente randomizados a realizar el tratamiento concomitante con quimiorradioterapia (basada en PF) o concomitancia con cetuximab. Los resultados preliminares de este estudio han demostrado un beneficio en SG para la estrategia de quimioterapia de inducción seguida de quimiorradioterapia comparado con el tratamiento de quimiorradioterapia (SG 54 meses vs 30 meses, y una tasa de SG a los 3 años del 58 vs 46%, HR 0.72, 95% CI 0.55-0.96) (148). Recientemente, el estudio randomizado fase III como el GORTEC 2007-02, ha comparado el tratamiento estándar de quimiorradioterapia, en este caso carbopaltino/fluoracilo, con el tratamiento de quimioterapia de inducción (TPF) seguido de tratamiento con cetuximab (anticuerpo monoclonal anti-EGFR) y radioterapia, sin demostrar diferencias estadísticamente significativas, recomendando la continuación del tratamiento concomitante de quimiorradioterapia como estándar (149).

La estrategia óptima de radioterapia en el conjunto del tratamiento secuencial también merece especial mención. Tanto en el tratamiento concomitante, como en el secuencial, es crucial prevenir y limitar la discontinuación del tratamiento con radioterapia, lo que a su vez se asocia a una limitación del beneficio en control locoregional aportado por la radioterapia. Además, es importante evitar en la medida de lo posible los retrasos entre la fase de inducción y la concomitancia, la cual se recomienda iniciar entre las 3-5 semanas tras la última dosis de quimioterapia de inducción (150). Debido a la toxicidad asociada a las estrategias de preservación de órgano, los retrasos o la imposibilidad de administrar el curso completo de radioterapia son hechos bastante frecuentes, siendo reportados hasta en el 20-30% de los casos (144). Asimismo, se ha reportado como la ampliación del curso de radioterapia (>8 semanas) tras el tratamiento de quimioterapia de inducción se asocia a peor SG (151). La optimización de las estrategias de preservación de órgano mediante quimioterapia y radioterapia, ya sean concomitante o secuencial, requiere por tanto de una adecuada selección de los pacientes candidatos, teniendo en cuenta las características del paciente, performance status, comorbilidades, edad, etc. Globalmente, el tratamiento de quimioterapia de inducción se reserva para pacientes con óptimo estado de salud,

primordialmente diagnosticados de tumores de laringe, y con alto riesgo de presentar enfermedad a distancia y fallo locoregional, como serían los pacientes con enfermedad “bulky” ganglionar (estadios N2b, N2c, o N3, y afectación primaria >T2) (41). Es importante a tener en cuenta que la decisión de realizar el tratamiento de inducción vendrá marcada por la definición de resecabilidad o irresecabilidad en cada centro. Además, es importante remarcar que la evidencia reportada respecto al beneficio de la quimioterapia de inducción difiere en función de la localización del tumor primario, siendo más limitada para tumores de cavidad oral. Esta escasez de datos se debe a los potenciales efectos tóxicos de este abordaje en esta localización tumoral concreta. Diferentes estudios han analizado el papel de la quimioterapia de inducción en cavidad oral sin demostrar un beneficio en SG para la quimioterapia de inducción. Así, un estudio reportado en tumores potencialmente resecables de cavidad oral en los que se administraba quimioterapia basada en cisplatino fluoracilo o cisplatino, fluoracilo y docetaxel seguido de cirugía y radioterapia no demostró beneficio en SG (152).

De forma global, para los pacientes en los que la enfermedad se considera resecable, el tratamiento concomitante con o sin quimioterapia de inducción se considera una estrategia útil y eficaz como preservación de órgano. En los pacientes considerados irresecables, la adición de quimioterapia a la radioterapia o el tratamiento de radioterapia en monoterapia en pacientes con peor performance estatus o comorbilidades, son considerados como opciones estándar, ya que permiten al paciente obtener un control locoregional óptimo asociado a un resultado funcional importante.

De forma global, se considera al tratamiento de quimioterapia de inducción, un abordaje óptimo para preservación laríngea, y el tratamiento secuencial a realizar dependerá de la respuesta obtenida a la quimioterapia de inducción. Así, para tumores con respuesta completa o parcial tras quimioterapia de inducción, el tratamiento de radioterapia en monoterapia se considera estándar. En los casos en los que se considere al paciente tributario de tratamiento concomitante tras la quimioterapia de inducción, la evidencia favorece el uso de carbopaltino semanal o tratamiento anti-EGFR con cetuximab y radioterapia. En algunos casos, con enfermedad persistente tras el tratamiento radical de quimioradioterapia, la cirugía de rescate podría considerarse como una opción válida. Esta indicación de cirugía dependerá tanto de la extensión tumoral pretratamiento como de la respuesta al mismo, reservando esta opción para pacientes considerados de inicio resecables que presentan una pobre respuesta del tumor

primario con la quimioterapia de inducción o para aquellos pacientes en los que la linfadenectomía es factible tras confirmación histológica de enfermedad residual ganglionar o PET positivo a las 12 semanas del fin del tratamiento de quimioradioterapia. Para valorar la enfermedad residual, es crucial un correcto examen físico, así como llevar a cabo pruebas radiológicas de estadiaje (TAC/RMN y/o PET). Sin embargo, la realización precoz de las mismas puede resultar de difícil interpretación, dado los frecuentes cambios postratamiento. Así, se ha sugerido que en pacientes sin afectación ganglionar clínica, la realización de un PET negativo tras el tratamiento tiene una especificidad aproximada del 90% (153, 154). Para los pacientes con PET-CT dudoso se ha sugerido la repetición del PET –CT en 4-6 semanas como método de seguimiento (155). También es importante considerar, que el rescate quirúrgico, aunque mejora el control locoregional, y podría prolongar la SG en algún subgrupo de pacientes, se asocia a múltiples comorbilidades (156-161).

## ***1.8 Virus del Papiloma Humano***

### **1.8.1 Introducción y Clasificación**

La infección por HPV es considerada como la enfermedad de transmisión sexual más frecuente en Estados Unidos, asociándose a la aparición de: condilomas, lesiones intraepiteliales, y carcinomas anogenitales que incluyen cáncer de cérvix, vagina, vulva, pene y canal anal. Se han descrito más de 100 serotipos de HPV, siendo el HPV-16 el relacionado hasta en el 90% de las ocasiones con los tumores de orofaringe (162). Otros serotipos de alto riesgo, como HPV 18, 31, 33 y 35, representarían el 10% restante de los casos (163). Los serotipos de HPV de alto riesgo, están relacionados con el potencial oncogénico de los genes virales E6 y E7. Estos genes codifican proteínas que desregulan los genes supresores tumorales p53 y Rb, lo que conllevaría inhibición de la apoptosis y por tanto una proliferación celular descontrolada (164).

### **1.8.2 Epidemiología y Factores de riesgo**

El cáncer de orofaringe asociado a la infección por HPV es reconocida como una entidad independiente (165) , con una incidencia que ha aumentado un 225% desde los años '80, y por tanto se considera un problema de salud a nivel internacional (7).

Así, en Australia, se ha observado un aumento del 20 al 64% entre los años 1987 al 2010 (166). Asimismo en Estados Unidos, la prevalencia de tumores de orofaringe HPV positivos ha aumentado de forma especialmente considerable al pasar de un 7% durante el periodo 2009-2012 a un 70% en la actualidad, principalmente en aquellos pacientes con historia de más de 20 parejas sexuales, siendo muy infrecuente la infección en personas que nunca habían tenido contactos sexuales (vaginal, oral o anal), lo que indicaría la asociación entre HPV y la transmisión sexual (167). La evidencia respecto a la transmisión oral-oral continúa siendo controvertida (168, 169). La prevalencia de HPV en orofaringe de las parejas de los pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos es del 4.7% de los casos, lo que es comparable con la prevalencia de la población global (169), sugiriendo como las parejas de los pacientes con tumores de orofaringe HPV eliminan de forma eficaz la infección de HPV, considerándose el tiempo medio hasta la desaparición de aproximadamente 12 meses (170).

### **1.8.3 Prevención y Vacunación**

En la actualidad no existe una herramienta eficaz de screening de tumores de orofaringe HPV positivos. Dado que la realización de biopsias de la mucosa oral es un procedimiento invasivo, se están desarrollando métodos como la citología exfoliativa del epitelio de la mucosa orofaríngea que puedan detectar de forma precoz cambios citológicos en las lesiones premalignas del epitelio (171). Respecto a la vacunación contra el HPV, inicialmente se desarrolló para disminuir la incidencia de los tumores de origen genital, recomendándose inicialmente en mujeres adolescentes. Posteriormente la agencia Americana del medicamento (US Food and Drug Administration) recomendó la vacunación en ambos sexos con el objetivo de prevenir la transmisión sexual, y así disminuir la incidencia de tumores de orofaringe HPV positivos, a la vez que disminuir el riesgo de desarrollar tumores anogenitales (172-174). En la actualidad hay tres vacunas disponibles: vacuna bivalente (subtipos HPV-16,-18); vacuna cuatrivalente (subtipos HPV-16, -18, -6 y -11) y vacuna novalente (HPV-6, -11, -16, -18, -31, -33, -45, -52, -58) (175). La vacunación favorece el desarrollo de una respuesta inmune duradera contra el HPV, siendo eficaz en el 97% de los casos, siempre y cuando no haya existido exposición previa al HPV (176), siendo ineficaz si ya se ha estado expuesto al HPV, por tanto la vacunación de las parejas de los pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos es ineficaz. La recomendación general en cuanto a la edad de vacunación

es iniciarse a los 11 o 12 años de edad, aunque podría iniciarse a los 9 años, siendo administrada como muy tarde a los 26 años. En hombres sanos, la recomendación sería iniciar la vacunación hasta los 21 años, mientras que en mujeres y hombres de riesgo (inmunocomprometidos, homosexuales); se recomienda la vacunación hasta los 26 años (175). Por todo ello, es importante educar a los pacientes respecto a los factores de riesgo de transmisión, manteniendo relaciones sexuales seguras, además de hacer entender la importancia de minimizar la exposición tabáquica y alcohólica.

#### **1.8.4 Carcinogénesis inducida por el Virus del Papiloma Humano**

El HPV es un virus pequeño de DNA, sin envoltura, con simetría icosaédrica, y que codifica para un total de 8-9 proteínas de aproximadamente 8000 pares de bases (177). El HPV se encuentra distribuido ampliamente en los queratinocitos de piel o mucosas de diferentes vertebrados, es transmitido por vía sexual y se ha relacionado con verrugas genitales (condilomas o condiloma acuminata), lesiones escamosas intraepiteliales y lesiones cancerosas como, tumores anogenitales (cérvix, vagina, vulva, pene y carcinomas anales) y tumores de cabeza y cuello (178). Cada virión está formado por 72 capsómeros, y cada uno de ellos contiene 5 moléculas de la proteína mayor de la cápsida, denominada L1. El genoma viral está formado por una molécula de DNA circular de doble hebra, asociada con nucleosomas formados por histonas celulares. Se han descrito aproximadamente 179 diferentes genotipos de HPV, viniendo las diferencias genotípicas marcadas por los diferentes aminoácidos que constituyen la proteína L1 (proteína estructural del virus que posee además efecto antigénico) (179). Son las características de esta proteína las que hacen que el virus se considere como de “bajo” o “alto” riesgo. Los genotipos de alto riesgo en los que su implicación en cáncer está más establecida son los subtipos HPV-16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52, y 56, relacionados con cáncer de cervix, cabeza y cuello, ano, vagina, vulva y pene (180).

El genoma del HPV-16, el más frecuentemente relacionado con los tumores de cabeza y cuello, contiene 6 genes de expresión temprana (denominados E1, E2, E3, E4, E5 y E6) y 2 de expresión tardía (denominados L1 y L2). Las proteínas de expresión temprana son proteínas no estructurales involucradas en la replicación, transcripción del genoma viral (E1-E5) y transformación tumoral de la célula huésped (E5, E6 y E7), por



Posteriormente se produciría la inducción de la ciclina E mediada por el factor de transcripción E2Fs activo y la fosforilación de Rb mediada por ciclina E-CDK2, entrando la célula en fase S. La proteína p16INK4A, codificada por el gen CDKN2A (locus INK4A del cromosoma 9p21), actúa como inhibidor de los complejos de ciclinas D1-CDK4 y D1-CDK6, y genera procesos de senescencia y diferenciación celular. Por tanto, la compleja interacción entre los complejos de ciclinas-CDKs y sus inhibidores determina si la célula puede pasar el punto de control del ciclo celular. El segundo control del ciclo celular (G2) ocurre cuando el DNA se está replicando, dado que en ese momento tiene lugar la corrección de los errores de replicación. En este proceso la proteína más implicada es p53, la cual se encuentra de forma “normal” en bajas concentraciones gracias a la proteína MDM2, que media en su degradación. Cuando se produce daño de DNA, diferentes genes como ATM, ATR fosforilan los reguladores de kinasas, CHK1 y CHK2, involucradas en la regulación de los puntos de control del ciclo celular. Este hecho se asocia a un aumento de la actividad de p53 mediante procesos de fosforilación. La proteína p53 actuaría induciendo la expresión de p21CIP (CDKN1A), el cual inhibe varios complejos ciclina-CDKs, y por tanto detiene el ciclo celular. Además de rol, p53 también media en la regulación de la apoptosis, entre otros muchos procesos. Las proteínas virales E6 y E7 tienen un papel relevante en la regulación tanto de Rb como de p53. Así, la proteína E6 se une a p53 degradándola, mientras que la proteína E7 se une e inactiva el complejo Rb. Por tanto, E6 y E7 generan la desregulación de los controles de ciclo celular, lo que conlleva inestabilidad genómica y finalmente entrada en ciclo celular, además de la inhibición de la apoptosis mediada por p53. Todo ello, permitirá la replicación viral, asociándose en caso de infección oncogénica a la expresión de E6 y E7 en las capas basales epiteliales, donde residen las células madre pluripotentes que permitirán que la infección persista en el tiempo (186-193).

### **1.8.5 Diagnóstico**

Como hemos comentado anteriormente, la infección oral por HPV es detectable en la mayoría de los pacientes con tumores de HPV positivos, sin embargo la incidencia en las parejas sexuales no está más aumentada que en la población en general (167, 169). El testado de HPV ha sido incluido recientemente como un procedimiento estándar para el diagnóstico de los tumores de orofaringe, según las guías de las

Sociedad Americana (68). Sin embargo, el método diagnóstico a realizar no está claramente definido, y varía entre las diferentes instituciones. En lo referente al diagnóstico de la infección por HPV es importante remarcar que este virus no puede ser cultivado, por lo que la detección depende de la identificación de marcadores indirectos de infección o de la identificación de DNA viral en tejidos infectados (194). Dada la forma clásica de presentación de los tumores HPV positivos, siendo tumores primarios pequeños, pero con extensa afectación ganglionar, la punción con aguja fina, es el procedimiento diagnóstico más habitual para obtener muestra tumoral, siendo importante si es posible obtener bloque celular para análisis de IHC-p16, así como de otros marcadores asociados a tumores escamosos como son p63 o CK5/6. Habitualmente, al tratarse de tumores primarios de pequeño tamaño, el diagnóstico requiere la realización de múltiples biopsias o técnicas más novedosas como biopsias guiadas por PET, e incluso en ocasiones, tonsilectomías unilaterales (195). A nivel citológico, los tumores HPV positivos suelen ser tumores pobremente diferenciados, con morfología basaloide, secundaria a la presencia de grupos celulares con núcleo hiper cromático, con escaso citoplasma y falta de queratinización. Estas características hacen que los tumores asociados a HPV compartan una apariencia similar al epitelio reticulado de las criptas tonsilares, donde son originados, por lo que las características histológicas por sí solas son insuficientes para concluir el diagnóstico de infección por HPV (196).

#### **1.8.5.1 Detección del RNA viral por qRT-PCR**

La detección de mRNA de E6/E7 virales mediante técnicas de PCR en muestras de tejido en fresco o congelado se considera actualmente el “gold standard” para detectar la infección activa por HPV, sin embargo no está comercializado para su realización de forma rutinaria (163). La expresión de mRNA de E6/E7 virales transcrito a partir de DNA viral integrado y episomal es crucial para la iniciación y progresión tumoral, por lo que su detección mediante PCR resulta el método diagnóstico más efectivo a la hora de detectar infecciones activas clínicamente relevantes (197), además de correlacionarse de forma directa con la carga tumoral activa (198).



### **1.8.5.2 Inmunohistoquímica de p16INK (IHC-p16):**

El estudio inmunohistoquímico (IHC) de p16INK4a (p16) está extendido en la práctica clínica como marcador indirecto, coste-efectivo, de la infección por HPV, sin embargo presenta varias limitaciones, como por ejemplo la variabilidad interobservador. Una intensa positividad nuclear y citoplasmática en más del 70% de las células neoplásicas es considerada positividad para infección por criterios inmunohistoquímicos (163). La IHC de p16 implica la presencia de la proteína p16, producto del gen supresor tumoral CDKN2A, que está suprimido en la mayoría de los tumores HPV negativos, y presente en los tumores HPV positivos (199). Sin embargo es importante tener en cuenta que la sobreexpresión de p16 puede ocurrir por otras alteraciones en reguladores del ciclo celular, como p53, p14, CD4, EGFR o mutaciones de RB1, y por tanto, la expresión de p16 puede ocurrir de forma independiente a la presencia de infección por HPV, hecho descrito en hasta en el 8% de los tumores de cabeza y cuello HPV negativos (200). Además las IHC-p16 no puede distinguir entre infección por HPV-16 y otros genotipos virales, y su utilidad como marcador surrogado de infección por HPV en otras localización tumorales, diferentes a orofaringe, en las que la incidencia de HPV es menor, no está claramente establecida y se puede asociar a casos falsos positivos (201). Por tanto, se considera que en los casos o localizaciones tumorales, en los que la probabilidad de presentar infección por HPV es elevada, como es en el caso de los tumores de orofaringe y pacientes jóvenes, de países occidentales, la sensibilidad y especificidad de IHC-p16 son muy elevadas, sin embargo en el caso contrario, como en casos de tumores de cavidad oral, la IHC-p16 puede tener limitaciones, y la tasa de verdaderos positivos caería hasta el 41%, lo que limitaría la utilidad de la técnica (202). Además, como hemos comentado, se puede producir la sobreexpresión de IHC-p16 en pacientes jóvenes con tumores escamosos de orofaringe, sin evidencia de infección por HPV-PCR (203).

Debido a estas limitaciones, algunos centros realizan de forma conjunta tanto IHC-p16 como la confirmación mediante test moleculares, PCR de HPV-E6/E7 o hibridación (ISH) de RNA viral. Diferentes estudios han sugerido una mayor sensibilidad para la IHC-p16 que para la HPV16-ISH (204). Además, a pesar de las limitaciones descritas, la IHC-p16 también ha demostrado su correlación pronóstica en

pacientes con tumores de orofaringe, permitiendo estratificar a los pacientes en función del riesgo de recidiva (205, 206), y siendo una técnica más sencilla de realizar que la cuantificación de mRNA de HPV16 E6 mediante qRT-PCR (207, 208). Por último, es importante remarcar que algunos estudios han sugerido como los pacientes positivos para IHC-p16 y HPV-PCR tiene mejor pronóstico que aquellos únicamente HPV-PCR positivos (209).

### **1.8.5.3 Detección del DNA viral por PCR**

El uso de técnicas de PCR para detección de DNA de HPV es habitual en investigación al considerarse una técnica coste-eficaz, con elevada sensibilidad. Sin embargo, esta técnica no es capaz de distinguir una infección clínicamente activa, al no poder identificar el DNA viral integrado o episomal (178), y además presenta una especificidad leve-moderada. En la actualidad, a pesar de que se ha descrito como aspecto positivo de esta técnica la alta correlación con la IHC-p16 (210), no existe un método estandarizado de PCR para aplicación clínica, por lo que la variabilidad entre laboratorio es elevada. De forma global, se recomienda la realización de test de detección DNA viral en tumores de orofaringe IHC-p16 negativos, dado el buen pronóstico de los tumores asociados a infección por HPV, lo que tendría importantes implicaciones en el manejo de dichos pacientes.

### **1.8.5.4 Hibridación *in situ***

La hibridación *in situ* de DNA viral, es una técnica que evalúa la integración del DNA viral en el genoma, permitiendo su uso en tejido en parafina. Esta técnica es altamente específica, rozando el 100% de especificidad, y que es capaz de detectar viriasis activas, permitiendo su visualización directa en el núcleo de la célula tumoral, sin embargo, la sensibilidad de esta técnica es limitada en presencia de un número bajo de copias virales, siendo aproximadamente del 86%, con una tasa de falsos negativos del 13-41% (163, 211, 212). Actualmente la técnica está disponible para testar en un mismo acto múltiples genotipos de HPV de alto riesgo, reportando el resultado como “positivo para HPV de alto riesgo” con una sensibilidad del 97% y una especificidad del 94% y con alta correlación con IHC-p16. Además dado su relativo bajo coste, su uso se

está generalizando en la práctica diaria (213). Recientemente, se ha desarrollado la detección de HPV E6/E7 mRNA mediante ISH, como método a utilizar en tejido parafinado, y al igual que ocurría con la detección de DNA, presenta una elevada sensibilidad (97%) y especificidad (93%) (213).

### **1.8.5.5 Correlación PCR/Hibridación *in situ*-Inmunohistoquímica**

De forma global se considera que la IHC-p16 tiene una correlación significativa con los estudios de expresión RNA E6/E7 (41), HPV-PCR o HPV-ISH (205, 209, 214). Sin embargo, en estudios que utilizaban de forma conjunta de IHC-p16 y estudios de HPV-DNA, se ha descrito como en un 5% de los tumores de orofaringe IHC-p16 positivos eran HPV negativos y hasta un 8% de los IHC-p16 negativos eran realmente HPV positivos (215), pudiendo variar esta frecuencia en función de los estudios (216, 217). De forma global se considera que la sensibilidad para IHC-p16 y PCR es alta, sin embargo la especificidad de ISH es mayor (214). Un estudio de validación mostró una sensibilidad y especificidad para IHC-p16 del 96.8% y 83.8%, mientras que la sensibilidad y especificidad para ISH fueron del 88% y 94.7% respectivamente (205). Respecto a la limitada especificidad de la IHC-p16, se ha sugerido que puede deberse a la presencia de p16 positivos sin evidencia de HPV-DNA, mientras que la baja sensibilidad de HPV16-ISH puede ser debida la presencia de otros subtipos de HPV de alto riesgo. También se ha reportado como la concordancia entre ambos tests puede variar en función de la localización tumoral, y así en tumores de cavidad oral, en un contexto donde la infección por HPV es infrecuente, la sensibilidad de la prueba sería aproximadamente del 80% con una especificidad del 93%, un valor predictivo positivo del 41% y un valor predictivo negativo del 99% (205, 209, 214).

Dada la elevada especificidad tanto de HPV-PCR o ISH para determinar la infección por HPV en muestras tumorales, junto con la alta sensibilidad de IHC-p16, se ha sugerido el uso conjunto de ambos métodos para poder determinar con mayor fiabilidad la infección por HPV. Se ha sugerido iniciar el estudio por la determinación de IHC-p16, a modo de screening, y una vez determinado el resultado positivo, realizar el test específico para HPV, ISH o PCR (218). Esta combinación aportaría evidencia no

sólo de que el tumor es HPV positivo, sino que es transcripcionalmente activo, mediante la sobreexpresión de IHC-p16 y E6/E7 mRNA.

**Tabla 1. Métodos diagnósticos de HPV**

<b>METODO</b>	<b>RACIONAL</b>	<b>VENTAJAS</b>	<b>DESVENTAJAS</b>
<b>HPV- DNA PCR</b>	HPV-16 es el subtipo más común en cabeza y cuello HPV es cuantificado por qRT-PCR	Elevada sensibilidad	Presenta Falsos positivos. Técnicamente más dificultoso que IHC/ISH. Sólo detecta HPV-16
<b>IHC-P16</b>	P16 sobreexpresado por inhibición de pRb mediada por E7. Pérdida de p16 es común en tumores HPV negativos	Más sencillo de realizar. Bajo coste	Método indirecto. No distingue subtipos de HPV
<b>HPV- DNA/RNA ISH</b>	HPV-16 es el subtipo más común en cabeza y cuello. Permite cuantificación y visualización directa en células tumorales	Más sencillo de realizar que PCR DNA/RNA. Bajo coste. Directa visualización HPV en núcleo celular	Únicamente detecta HPV-16
<b>E6/E7- mRNA qRT-PCR</b>	Detección de RNA de los virales de HPV transcritos	Precisión HPV y subtipo. <b>Considerado método estándar.</b>	Coste, dificultoso técnicamente, requiere especialización

## **1.8.6 Tumores escamosos de cabeza y cuello relacionados con la infección por HPV**

### **1.8.6.1 Epidemiología**

Desde que se describiera por primera vez la asociación causal entre HPV y cáncer, en concreto cáncer de cérvix en el año 1970 por el premio Nobel Harald zur Hausen (177), se han llevado a cabo grandes avances en el conocimiento epidemiológico de dicha infección, hasta llegar a la identificación del HPV en tumores de orofaringe en 1983 (219). Desde entonces, se ha establecido la relación causal del

HPV de un subgrupo de tumores de cabeza y cuello (180) que ha presentado un aumento significativo en su incidencia desde las últimas dos décadas, particularmente relevante es el caso del aumento de la incidencia en tumores de orofaringe (7, 204, 208, 220). De forma característica, se ha descrito como en la mayoría de los pacientes con tumores de orofaringe, particularmente aquellos con tumores de lengua y región tonsilar, no comparten los factores de riesgo tradicionales, tabaco y alcohol, sino que sería el HPV, en concreto el HPV-16, el agente etiológico más frecuentemente relacionado (221). Otros genotipos de HPV de alto riesgo, como HPV-18, 31, y 33, son más infrecuentes, y raramente causan tumores de cabeza y cuello en otras localizaciones (222). Diferentes estudios epidemiológicos han demostrado como aunque globalmente la incidencia de los tumores de cabeza y cuello localizados en laringe, hipofaringe y cavidad oral ha disminuido desde principio de los años '80, relacionado con la disminución del hábito tabáquico, principal factor de riesgo para estos tumores (223), la incidencia de tumores de orofaringe ha aumentado progresivamente en países de occidentales, sugiriendo de forma indirecta el aumento de la prevalencia de infección por HPV-16 (224, 225). A nivel mundial la prevalencia de la infección por HPV en tumores de cabeza y cuello se considera alrededor del 26%, siendo mayor en tumores de orofaringe (35%) (226). Sin embargo, esta incidencia es variable en función de las diferentes regiones geográficas, siendo la prevalencia más significativa en Norte América que en Europa y Asia (7). Así, diferentes estudios de los años '90 demostraron como en Estados Unidos hasta un 50% de los tumores orofaríngeos eran atribuibles al HPV, sin embargo estudios más recientes sugieren incluso una mayor relación, llegando hasta el 70-80% de los casos de Norte América, Canadá, Japón y países de Europa del Este, y todo a pesar de la disminución global de la incidencia de tumores de orofaringe. Este aumento de incidencia es particularmente llamativo en hombres jóvenes de países desarrollados. De forma relevante, mientras que en Norte América se ha observado una disminución de hasta el 50% de los tumores de cabeza y cuello HPV negativos desde 1998 hasta 2004, la prevalencia de los tumores HPV positivos ha aumentado un 225% en el mismo periodo de tiempo, por tanto, si esta tendencia persiste, la proporción de tumores de orofaringe HPV positivos superaría a la de los tumores de cérvix en 2020 (7). En mujeres, estudios epidemiológicos realizados principalmente en países europeos, muestran un aumento de ambos tipos tumorales, HPV positivos y negativos, lo que probablemente esté en relación con el aumento del hábito tabáquico en este subgrupo de pacientes (227). El incremento en la incidencia de los tumores de orofaringe asociados a

HPV se relaciona en gran parte por los cambios en las prácticas sexuales, al tratarse la infección por HPV de una infección de transmisión sexual. La presencia de HPV en cavidad oral se observa al inicio de las relaciones sexuales, siendo del 1.5% de los 12-15 años, del 3.3% entre los 16 a los 20 años y de un 4.5% a los 21 años (172). Asimismo, la infección oral por HPV se asocia con un mayor número de parejas sexuales (sexo oral  $\geq 6$  parejas; odds ratio [OR] 3.4; 95% CI, 1.3–8.8;  $P = .009$ ; y sexo vaginal  $\geq 26$  parejas OR 3.1; 95% CI, 1.5–6.5;  $P = .002$ ) (173). Sin embargo, se considera que hasta el 65-80% de los casos de detección de HPV en adultos sanos, la infección oral sería erradicada en aproximadamente 12 meses (228). Paralelamente se ha descrito como el tiempo de exposición entre HPV y la probabilidad de desarrollar un tumor de orofaringe superaría probablemente los 10 años (229). También se ha descrito como, aunque la infección oral por HPV es detectable en la mayoría de los pacientes con tumores HPV positivos, la incidencia de HPV en parejas sexuales no está aumentada respecto a la población general, que se ha estimado aproximadamente del 7% (167). Estudios en las parejas sexuales de pacientes con tumores de orofaringe HPV han demostrado que la mayoría de las parejas son capaces de erradicar la infección activa por HPV cuando son expuestas, ya que la presencia de HPV en las parejas y en los pacientes con tumores de orofaringe es de un 4% (similar a la población global) y un 65% respectivamente (169). A su vez, la presencia de HPV-16 en cavidad oral se ha relacionado con el desarrollo de tumores de orofaringe, con una media de latencia de aproximadamente 4 años, con una ORR 22.4 (95% CI 1.8-276.7) (230).

En tumores de cabeza y cuello de otras localizaciones diferentes a orofaringe, el papel de la infección por HPV está menos definido. Un metaanálisis que incluía 148 estudios y más de 12.163 casos de tumores escamosos de cabeza y cuello, demostró como la prevalencia de HPV variaba entre el 45.8% observada en tumores de orofaringe, a un 24.2% en tumores de cavidad oral y un 22.1% en tumores laríngeos (231). En otro estudio internacional, con análisis central de las muestras tumorales de 3680 casos de tumores escamosos de cabeza y cuello, la prevalencia de DNA de HPV fue del 24.9% en tumores de orofaringe, 7.4% en cavidad oral y 5.7% en tumores laríngeos. En este mismo estudio, se realizaron estudios de mRNA de HPV e IHC-p16. (232). En otro estudio de 520 tumores de cabeza y cuello se llevaron a cabo perfiles de expresión génica que encontraron como hasta un 4.1% de los tumores no-orofaríngeos tenían presencia de HPV, siendo tumores comparables en los perfiles de expresión

génica, metilación de DNA y características histopatológicas, similares a los tumores de orofaringe HPV positivos. Sin embargo, en este estudio se observó la limitación del impacto pronóstico del HPV en tumores no-orofaríngeos, al no observar una mejor SG comparado con los tumores no-orofaríngeos que HPV negativos(233).

### **1.8.6.2 Presentación clínica**

Las características clínicas y demográficas de los tumores de cabeza y cuello HPV positivos se diferencian claramente de los pacientes con tumores HPV negativos, por lo que se consideran una entidad clínica independiente. Los tumores de orofaringe asociados a infección por HPV suelen ser tumores primarios pequeños (estadíos T iniciales, T1-T2), localizados principalmente en la región tonsilar y en base de lengua, y con afectación ganglionar avanzada (estadío N, N2-N3) (234, 235). A diferencia de los tumores escamosos de cabeza y cuello de otras localizaciones, como cavidad oral, los tumores HPV positivos, suelen presentarse en la orofaringe de pacientes jóvenes (<40 años). También se ha descrito como la edad de presentación presenta una distribución bifásica, con picos a los 30 y a los 55 años (224, 236). Asimismo, son tumores más frecuentes en hombres (5:1) (167), blancos (237), de alto nivel socio-económico y sin clara historia de hábito tabáquico o alcohólico (238). De forma llamativa, algunos estudios recientes han demostrado una alta tasa de fumadores activos o pasivos entre el subgrupo de tumores HPV positivos (60-70%), siendo la tasa de no fumadores bastante inferior (208, 239). Estas diferencias en edad, junto con las menor comorbilidad asociada con la menor exposición al tabaco y consumo de alcohol, tiene implicaciones en cuanto a la tolerabilidad de los tratamientos, y por tanto, en el pronóstico de dichos pacientes. De forma característica, estos pacientes suelen presentar una masa en nivel cervical II (cadena yugular alta), sin claro tumor primario en la exploración física, y con características citológicas indiferencias (basaloides) (224, 240). De forma característica, se ha descrito como los pacientes con tumores de orofaringe HPV tienen menor incidencia de presentar segundas neoplasias (241).

**Tabla 2: Características clínicas diferenciadas en tumores HPV negativos y positivos**

<b>Características</b>	<b>HPV negativos</b>	<b>HPV positivos</b>
<b>Incidencia</b>	Disminuye	Aumenta
<b>Etiología</b>	Tabaco y alcohol	Transmisión sexual
<b>Edad</b>	>60 años	<60 años
<b>Mutaciones TP53</b>	Frecuentes	Infrecuentes
<b>Localización característica</b>	Ninguna	Orofaringe
<b>Pronóstico</b>	Pobre	Favorable

### **1.8.6.3 Características moleculares de los tumores escamosos de cabeza y cuello relacionados con la infección por HPV**

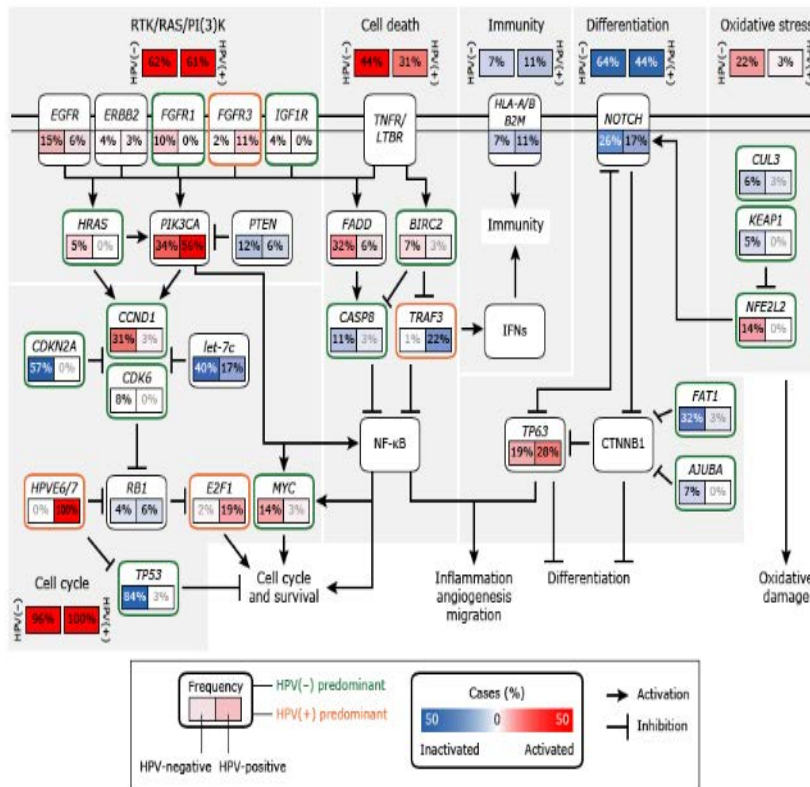
Al igual que ocurre con las características clínicas, los tumores HPV positivos también se asocian a unas características moleculares diferenciadas de los tumores HPV negativos. Aunque en ambos tumores, las vías de p53 y pRb están frecuentemente alteradas, los mecanismos de inactivación de las mismas difieren. Así, las proteínas virales E6 y E7 en tumores HPV positivos, inactivan de forma funcional a p53 y pRb, mientras que en hasta el 50% de los tumores HPV negativos, la inactivación de las vías se produce vía mutaciones en p53, principalmente en el dominio de unión al DNA y relacionadas con el tabaco, además de presentar frecuentemente pérdidas de copias cromosómicas, hipermetilaciones e incluso mutaciones del promotor de CDKN2A, asociadas a pérdida de expresión de p16(242-244). La actividad de p53 se puede desregular mediante otras alteraciones moleculares como la sobreexpresión o amplificación del gen MDM2, la delección del gen CDKN2A y mediante la degradación de E6, por tanto se considera que hasta el 80% de los tumores de cabeza y cuello presentan alteraciones de p53 (185, 245). Diversos estudios han reportado las diferencias genómicas entre los tumores HPV positivos y negativos (246-248). Así, se ha descrito como los tumores HPV positivos presentan una menor tasa mutacional (231, 249), y se asocian a una firma génica característica denominada patrón APOBEC, el cual presenta frecuentes cambios de citosina por timidina (TpC), claramente diferenciado con el patrón clásico de los tumores HPV negativos, basado principalmente en la presencia de transversiones cromosómicas (221, 250, 251).



En cuanto a las alteraciones somáticas asociadas a los tumores HPV positivos, se han descrito como las pérdida de TRAF3, ubiquitin ligasa y receptor del factor nuclear- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B), involucrado en la inmunidad antiviral (252) y las mutaciones activadoras de PIK3CA (E542K/E545K) son las alteraciones somáticas más frecuentes. En cambio, los tumores HPV negativos, se caracterizan por presentar mutaciones en FAT1, CASP8, HRAS y PIK3CA (mutaciones distribuidas en todo el gen) (221). Otra diferencia molecular entre tumores HPV positivos y negativos hace referencia al patrón de alteraciones cromosómicas. A pesar de compartir alteraciones comunes, como amplificaciones en 1q, 3q,5p,8q y deleciones en 3p,5q,11q, región que codifica los factores de transcripción TP63 y SOX2, y el oncogen PIK3CA (221), otras alteraciones estructurales son características en cada subtipo. Así, los tumores HPV positivos presentan hasta en un 20% de los casos amplificaciones del gen E2F1 (20q1), que se encuentra en el cromosoma 7, y esencial para el inicio del ciclo y la proliferación celular y además suelen presentar menor tasa de amplificación de EGFR (206). En contra, los tumores HPV negativos, se caracterizan por presentar amplificaciones de 11q, donde se encuentran importantes genes supresores tumorales como ATM, amplificaciones de EGFR (15% de los casos) y ciclina D1, correlacionadas con peor pronóstico (253-255). Las mutaciones oncogénicas en KRAS (G12C y G12V) son infrecuentes en carcinomas escamosos, y ocurren a una muy baja frecuencia (1%-5%) (249). Además, los tumores que presentan integración DNA del HPV, como por ejemplo alta expresión de RNA HPV E6/E7 presentan mayor proliferación e inestabilidad genómica, ya que la integración suele producirse cerca de genes supresores tumorales como RAD51 (243, 256).

Recientemente, dos publicaciones reportadas por *Stransky et al.* (247) y *Agrawal et al.*(257) han descrito nuevas mutaciones en genes como NOTCH1, IRF6 and TP63, involucrados en los procesos relacionados con diferenciación escamosa, siendo la mayoría de las mutaciones de NOTCH1 mutaciones truncantes lo que sugiere su rol como gen supresor tumoral. Además un extenso estudio ha reportado las alteraciones moleculares más frecuentes de los tumores de cavidad oral (258) (figura 6). En este estudio, 4 vías moleculares estaban frecuentemente alteradas, entre ellas la vía de señal mitótica, NOTCH, ciclo celular y TP53, presentando mutaciones en FAT1y CASP8. De forma relevante, hasta en el 80% de los tumores de cavidad oral se detectaron

alteraciones moleculares sobre las que podría realizarse algún tipo de tratamiento dirigido.



**Figura 6. Alteraciones moleculares en Tumores de Cabeza y Cuello (HPV positivos y HPV negativos).** Figura adaptada de Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic of head and neck squamous cell carcinomas. Nature 2015; 517:576(221)

### Subgrupos tumorales de los tumores escamosos de cabeza y cuello basados en análisis de expresión génica.

Diferentes estudios de expresión génica han intentado clasificar los tumores escamosos de cabeza y cuello en diferentes grupos pronósticos en función de sus perfiles de expresión génica que reflejen diferencias biológicas y pronósticas. La identificación de subgrupos basados en perfiles de expresión génica ha ayudado al desarrollo de terapias dirigidas en otras patologías tumorales, sin embargo su utilidad en tumores de cabeza y cuello está aún por determinar. El primer estudio relevante fue reportado en 2004 por *Chung et al* (259) describiendo 4 subtipos moleculares basados en análisis de expresión génica en 60 tumores de cabeza y cuello. Estos subtipos moleculares denominados, basal, atípico, mensequimal y clásico, fueron confirmados en

los estudios del TCGA (221), el cual diferenció entre grupo basal (31%), caracterizado por baja expresión de CDKN2A (p16<sup>INK4A</sup>) y amplificaciones o sobreexpresión de TP63, el subgrupo mesenquimal (27%) con alta expresión de genes asociados con la transición epitelio-mesenquimal y mutaciones en genes FGR1/2, el subgrupo atípico (24%) con alta frecuencia de tumores HPV positivos, mutaciones de PIK3CA, y baja expresión de EGFR, y por último el subgrupo clásico (18%) con elevada expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo. Conjuntamente, esta clasificación molecular se demostró pronóstica, al predecir la supervivencia libre de recurrencia. De forma paralela, los subgrupos basales, mesenquimal y clásico se correlacionaban de forma relevante con el subtipo basal y clásico de cáncer de mama y pulmón (248). Recientemente, en un población con elevada frecuencia de tumores HPV positivos (42%), reportaron como los tumores HPV positivos podían subdividirse en dos subgrupos moleculares diferenciados, quedando la clasificación molecular de la siguiente forma: subtipo basal (elevada expresión de EGFR y genes relacionados con hipoxia, como HIF1A), mesenquimal, clásico, HPV positivo-mesenquimal y HPV positivo-clásico. De forma significativa, los tumores HPV positivos-mesenquimales presentaban mayor sobreexpresión de genes involucrados en la respuesta inmune y el control del ciclo celular que los tumores HPV negativos-mesenquimales. De forma similar ocurre en los HPV positivos-clásicos. Paralelamente, se demostró la correlación pronóstica de esta clasificación, siendo los dos subgrupos HPV positivos los que presentaban un mejor pronóstico, principalmente el subgrupo HPV positivo-mesequimal. Por tanto, la caracterización molecular de los tumores de cabeza y cuello y de forma significativa, la de los tumores HPV positivos, permitiría por un lado información pronóstica relevante, así como realizar diferentes abordajes terapéuticos, que incluirían el posible desarrollo de nuevas terapias dirigidas para cada subtipo tumoral (249).

#### **1.8.6.4 Impacto pronóstico de la infección por HPV en tumores de cabeza y cuello localmente avanzados**

Los primeros datos relevantes respecto al impacto pronóstico del HPV en tumores de cabeza y cuello fueron reportados en el año 2000 por *Gillison et al* (260). En este estudio, los autores confirmaron por un lado la positividad por HPV en el 25% de

los tumores de orofaringe y la relación inversa entre HPV y exposición al tabaco y alcohol. Por otro lado y de forma significativa, fueron capaces de describir como a pesar de que los tumores HPV suelen debutar de una forma más agresiva, estos presentaban una mejor SG. Posteriormente, la publicación por parte de *Fakry et al*, confirmó dicho impacto pronóstico del HPV en el seno de un estudio clínico randomizado que evaluaba el tratamiento de quimioterapia de inducción basado en carboplatino y paclitaxel seguido de tratamiento concomitante de quimiorradioterapia (usando paclitaxel semanal). En este estudio, se detectó un 40% de tumores HPV positivos, los cuales presentaban mejor SG a los dos años (95 vs 62%) (261). Desde entonces diferentes estudios retrospectivos han confirmado dicho impacto pronóstico (124, 173, 223, 262). Además del beneficio en SG, también se ha sugerido un mejor control locoregional en pacientes con tumores HPV positivos (263). Recientemente, una revisión de 56 estudios prospectivos y retrospectivos ha confirmado la mejor SG y menor riesgo de recurrencia de los pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos (p16) (264). Por todo ello, se ha sugerido que el estatus de HPV debería considerarse un factor de estratificación en los diferentes estudios clínicos, o incluso realizar estudios clínicos diferenciados para los pacientes HPV positivos y negativos (41).

Este mejor pronóstico de los tumores HPV positivos se ha demostrado con todas las estrategias de tratamiento estándar, como la radioterapia adyuvante (265), el tratamiento concomitante de quimiorradioterapia (124, 206, 219), el tratamiento de inducción de quimioterapia seguido de quimiorradioterapia (261, 266) e incluso con radioterapia radical en monoterapia (239). Respecto al beneficio de la radioterapia en pacientes HPV positivos, un estudio de la RTOG, en el que se exploraba la eficacia de 4 estrategias de radioterapia diferentes, incluyendo fraccionamiento estándar, diferentes hiperfraccionamientos y el “boost”, demostró como el 40% de pacientes positivos para HPV (IHC-p16) presentaban mejor SG (49 vs 20%), supervivencia libre de recidiva (43 vs 19%) y supervivencia libre de progresión a los 5 años (29 vs 55%,  $p < .001$ ) (239). De forma adicional, otros estudios han sugerido también el papel pronóstico de la infección por HPV en tumores localmente avanzados tratados únicamente con radioterapia (267, 268).

Las recomendaciones de tratamiento complementario a la cirugía con quimiorradioterapia de los pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos se

consideras similares al del resto de tumores HPV negativos, y por tanto en función de la presencia de los factores de riesgo establecidos (márgenes positivos y afectación extracapsular ganglionar). Sin embargo, es importante remarcar que los estudios RTOG9501 (101) y EORTC 22931 (102) en los que se llevaron a la validación de estos factores de riesgo, no incluyeron el análisis del estatus de HPV, por lo que su impacto en esta estrategia de tratamiento es aún desconocido.

Diferentes estudios también han demostrado el papel pronóstico de la infección por HPV en pacientes que realizan tratamiento concomitante radical con quimiorradioterapia. El subanálisis del estudio ECOG2399 aportó la primera evidencia prospectiva de éste impacto, observando beneficios en SG y tasa de respuestas tanto a la quimioterapia de inducción como a la concomitancia de quimioterapia y radioterapia (261). Desde entonces, diferentes subanálisis de estudios prospectivos, han confirmado los mismos hallazgos en pacientes tratados con quimiorradioterapia, de forma independiente a la realización de quimioterapia de inducción (266) (124, 206). De forma global, se considera que los tumores de orofaringe HPV positivos presentan un beneficio una reducción en el riesgo de muerte del 58% comparado con los tumores HPV negativos. El estudio más relevante hasta la fecha en cuanto al factor pronóstico del HPV es el estudio fase III RTOG 0129 (124). En dicho estudio, se comparó la eficacia de dos esquemas de radioterapia, radioterapia fraccionada acelerada acompañada de sobreimpresión o radioterapia estándar, administrados ambos con quimioterapia concomitante con altas dosis de cisplatino (2 ó 3 ciclos). En total, 433 pacientes con tumores de orofaringe, 68% de los cuales eran HPV positivos (IHC-p16) fueron incluidos. Los análisis por subgrupos, en función del estatus de HPV, demostraron como, a misma edad, estadio tumoral y performance status, los pacientes con tumores HPV positivos presentaban mejor SG (82.4 vs 57.1%, HR 0.42, 95% CI 0.27–0.66) y SLP a los 3 años (73.7% vs 43.4%, correspondiendo a una reducción de riesgo de recurrencia locoregional del 13.6% en el grupo HPV positivo comparado con el 35.1% del subgrupo HPV negativo). Otro subanálisis dentro del mismo estudio sugirió como la IHC-p16 presentaba mayor impacto pronóstico que el estatus de HPV por PCR, sugiriendo como posible hipótesis el hecho de que a pesar de la elevada sensibilidad de las técnicas de hibridación para HPV-16, algunos subtipos no-HPV-16, pudieron ser clasificados como falsos negativos. De forma adicional, el análisis multivariado reveló otros factores pronósticos para supervivencia global como la edad,

raza, performance status, estadio tumoral, estadio ganglionar y exposición tabáquica. A este respecto, se han reportado datos contradictorios respecto al papel etiológico de la exposición tabáquica en los pacientes HPV positivos. La infección por HPV, también se presenta en fumadores activos y grandes consumidores de alcohol (167), sin embargo no está determinado si la propia infección por HPV favorece el desarrollo de tumores de orofaringe en estos casos con exposición a factores etiológicos clásicos. Algunos estudios han reportado como los pacientes con tumores HPV positivos con historia de exposición tabáquica presentan peor pronóstico que los pacientes no fumadores HPV positivos, sugiriendo por tanto el papel pronóstico independiente del tabaco (207, 234, 269-271). Según los datos de éste estudio, se estimó un aumento del 1% en riesgo de muerte por cáncer por cada paquete/año adicional. La información pronóstica aportada por este estudio, permitió que por primera vez se pudiera clasificar a los pacientes en 3 grupos de riesgo de recurrencia cuando se asociaban diferentes factores pronósticos, como el estatus de HPV, la exposición tabáquica ( $>$  ó  $\leq 10$  paquetes/año) y el estatus de afectación ganglionar (N0-N2a vs N2b-N3) para tumores HPV positivos o el estadio tumoral (T1-T3 vs T4) para tumores HPV negativos, poniendo esta clasificación claramente en relieve el impacto pronóstico del estatus de HPV. Siguiendo clasificación, el grupo de bajo riesgo englobaría a los pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos y estatus ganglionar N0-N2a, el grupo intermedio correspondería a los pacientes HPV positivos con afectación T2-T3 del tumor primario, y los tumores del alto riesgo serían los tumores HPV negativos. En función de estos factores, se determinó que la SG estimada a los 3 años era del 93%, 70.8% y 46.2% para los subgrupos de bajo, intermedio y alto riesgo de recurrencia, respectivamente. Estos resultados, hicieron que ésta clasificación pronóstica se utilice de forma habitual como factor de selección o estratificación en diferentes estudios clínicos (124). Otros estudios también han reportado los resultados de los pacientes HPV positivos tratados con quimiorradioterapia. Así, en un estudio de la RTOG en el que se valoraba la eficacia de la adición de cetuximab al tratamiento de quimioterapia basada en altas dosis de cisplatino trisemanal concomitante con radioterapia acelerada, no se observaron diferencias globales en los pacientes tratados con cetuximab. Del total de pacientes incluidos, 321 (36%) pacientes con tumores de orofaringe fueron testados para HPV (IHC-p16), siendo positivos el 73%. En este subgrupo de pacientes, se observó un beneficio en SG (86 vs 60%,  $P < .001$ ), supervivencia libre de enfermedad (73 vs 50%,  $P < .001$ ) y SLP a los 3 años (17 vs 32%,  $P < .001$ ) (134). Otro estudio fase 3 en el que

465 pacientes con tumores de orofaringe completaron tratamiento con radioterapia estándar de forma concomitante con dos regímenes diferentes de tratamiento (dosis 100 mg/m<sup>2</sup> vs 75 mg/m<sup>2</sup>) junto a tirazapina, demostró una tasa de positividad para IHC-p16 del 57%, e igualmente el grupo IHC-p16 positivo presentó mejores resultados tanto en supervivencia libre de enfermedad como en SG (91% vs 74%; P = .004) (206).

De forma similar a la quimioradioterapia, diferentes estudios han evaluado el impacto pronóstico del HPV en el tratamiento de inducción. Los datos más relevantes son los aportados por el estudio pivotal fase 3, TAX324. El estatus de HPV se pudo determinar en 264 pacientes con tumores de orofaringe, resultando positivos el 50% de los casos, mediante HPV-16 PCR. Nuevamente, los pacientes HPV positivos presentaban mejor SG (82% vs 35%; P < .001), SLP a los 5 años (13% vs 42%; P = .0006) y supervivencia libre de enfermedad (78% vs 28%; P < .001) (266). Finalmente, hasta dos metaanálisis han confirmado el impacto de la infección por HPV en SG, supervivencia libre de enfermedad y SLP de los tumores de cabeza y cuello, incluso cuando se ajustan los resultados en función de otros factores pronósticos de riesgo como edad, sexo, exposición tabáquica y estadio (262, 272). De forma global, se estima que entre el 10-25 % de los tumores de orofaringe HPV positivos presentara progresión tumoral durante los 3 años tras completar el tratamiento oncológico primario (167, 261, 273). Sin embargo, el estudio RTOG ha demostrado una SG media de 2.6 años en los tumores de orofaringe HPV positivo comparado con 0.8 años para los tumores HPV negativos (274). La tasa de metástasis a distancia se considera similar en los pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos como negativos (167, 274), por lo que dado el excelente control locoregional de estos pacientes, la presencia de metástasis continúa siendo la mayor causa de mortalidad en este subgrupo (275). Por último, también se ha descrito como los pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos también presentan mejor pronóstico tras la recurrencia de la enfermedad, con una SG media tras las primera recurrencia de 2.6 años comparado con 0.8 años para los tumores HPV negativos (HR 0.49, 95% CI 0.39-0.70) (265).

Las implicaciones pronósticas de la infección por HPV en tumores de cabeza y cuello de otras localizaciones diferentes a orofaringe, no están claramente establecidas. Sin embargo, a pesar de las características retrospectivas de los datos, se ha sugerido que los tumores HPV positivos presentan mejor SG que los HPV negativos

independientemente de la localización tumoral (202, 265, 276). La serie más extensa reportada hasta la fecha, ha incluido 1054 tumores de cabeza y cuello en los que usando los antígenos E6 o E6 de HPV se determinaba la positividad para HPV (276). En este estudio, la SG de los pacientes demostraban anticuerpos anti-E6/E7 era significativamente mayor (HR 0.45, 95% CI 0.18-0.80). De forma interesante, este estudio incluyó 168 pacientes con tumores laríngeos en los que también se observó este beneficio (HR 0.29, 95% CI 0.10-0.85) (276).

### **1.8.6.5 Manejo terapéutico de los tumores de cabeza y cuello relacionados con la infección por HPV.**

Debido a las características clínicas y moleculares claramente diferenciadas entre los tumores HPV positivos y negativos, junto con el impacto pronóstico del HPV, se ha propuesto que dichos pacientes se podrían beneficiar de un manejo terapéutico diferenciado. Sin embargo, en la actualidad, se considera que fuera de ensayo clínico, el abordaje terapéutico debe de ser similar al de los tumores HPV negativos. Las estrategias terapéuticas que se han propuesto en tumores HPV positivos tienen como finalidad mantener el excelente pronóstico de estos pacientes pero reduciendo la tasa de efectos secundarios agudos y tardíos derivados de los tratamientos estándar como la concomitancia con quimioradioterapia (277). Diferentes estrategias como la desintensificación de tratamiento, la sustitución de la quimioterapia a altas dosis de cisplatino por los anticuerpos monoclonales e inmunoterapias, se están desarrollando actualmente dentro de ensayos clínicos (208, 278-280).

Diferentes factores biológicos y moleculares aportan el racional de llevar a cabo estas estrategias terapéuticas diferenciadas para los pacientes HPV positivos. Se ha sugerido que estos pacientes podrían beneficiarse de dosis reducidas de radioterapia, debido a la extrema radiosensibilidad de estos pacientes relacionada con el aumento de la apoptosis secundaria a la inhibición de la degradación de p53 por HPV-E6, (280), así como al fallo en la reparación de las roturas de doble cadena de DNA mediada por la recombinación homóloga inducida por p16 (278). Además, los tumores HPV positivos, son considerados tumores menos hipóxicos, y por tanto asociados a un fenotipo más radiosensible (281). Recientemente se ha demostrado como la modulación del sistema



inmune también juega un papel importante en los tumores HPV positivos, los cuales presentan mayor infiltración inmune además de altos niveles de células T circulantes específicas de la proteína HPV-16 E7, todo ello relacionado a su vez con el mejor pronóstico asociado a estos pacientes (282-285). Otros factores pronósticos, como el tabaco, reconocido factor etiológico en tumores de cabeza y cuello HPV negativos, también se ha intentado correlacionar con peor pronóstico en pacientes HPV positivos (165, 286). Así, pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos e historia de exposición tabáquica de más de 20 paquetes/año presentan una tasa de SG a los 2 años del 80%, comparado con el 95% de los pacientes con menor exposición tabáquica, siendo ésta tasa aún mejor que la SG a los 2 años de los tumores HPV negativos, estimada en el 63% (261). Por tanto, la exposición tabáquica es un factor pronóstico relevante tanto en tumores HPV positivos como negativos, y se considera un factor de estratificación de riesgo a tener en cuenta a la hora de diseñar nuevas estrategias de tratamiento para este subgrupo de pacientes. Por último, otro factor a tener en cuenta en pacientes HPV positivos es la presencia de afectación adenopática retrofaringea, asociada a peor pronóstico (287).

A pesar de que en la actualidad el manejo de los pacientes con tumores HPV es similar al de los HPV negativos, la clara diferenciación pronóstica de estos pacientes ha propiciado que durante este año 2017, el sistema internacional de estadiaje (TNM: tumor, node, metastasis) de la Union for International Cancer Control (UICC)/American Joint Committee on Cancer (AJCC) haya reconocido por primera vez este hecho diferencial, creando sistemas de estadificación diferenciados y ajustados a la realidad pronóstica de ese subgrupo (figura 8). Este hecho será relevante a la hora de estratificar en función del riesgo de recidiva y decidir de forma más exitosa el abordaje terapéutico de este subgrupo.

Estadio T	Características
T0	Ausencia tumor primario identificado
T1	Tumor $\leq 2$ cm
T2	Tumor $> 2$ cm pero $< 4$ cm
T3	Tumor $> 4$ cm o extensión superficie lingual de epiglotis
T4	Enfermedad local moderadamente avanzada, tumor invade laringe, músculo extrínseco lengua, pterigoideo medial, paladar duro o mandíbula

Estadio N Clínico	Características
Nx	Afectación ganglionar no valorable
N0	Sin afectación ganglionar
N1	$> \text{ó} = 1$ ganglio ipsilateral $< 6$ cm
N2	Afectación contralateral o bilateral, todos $< 6$ cm
N3	Ganglios $> 6$ cm

Estadio N Patológico	Características
Nx	Afectación ganglionar no valorable
pN0	Sin afectación ganglionar
pN1	Afectación en $\leq 4$ ganglios
N2	Afectación en $> 4$ ganglios

### Estadio anatómico y pronóstico TNM

Categoría T	Categoría N		
	N0	N1	N2
T0	NA	I	II
T1	I	I	II
T2	I	I	II
T3	II	II	III
T4	II	II	III

\*cualquier M1 se considera estadio IV

**Figura 8: Estadiaje TNM de tumores de orofaringe HPV positivos (p16). AJCC Cancer Staging 2017.** Figuras adaptadas de Amin MB, Edge SB, Greene FL, et al. AJCC Cancer Staging Manual, Eight Edition (2017) (68)

Diferentes estudios clínicos están valorando la estrategia de desintensificación de tratamiento, tanto en lo referente a la radioterapia o la quimioterapia en pacientes HPV positivos de bajo riesgo. Resultados iniciales de un pequeño estudio fase II de quimioradioterapia con desintensificación de tratamiento (cisplatino semanal e IMRT 60 Gy/30 fracciones) en pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos (excluyendo T4, N3 o M1) e historia de exposición al tabaco <10 paquetes/año demostraron una tasa de respuestas completas patológicas significativa (86%) asociado a una buena tolerancia, sin embargo este estudio no ha reportado datos de eficacia a largo plazo (288). Datos de eficacia a largo plazo de la estrategia de desintensificación han sido reportados en el estudio ECOG 13081 en el que los pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos y estadios III o IV tratados con quimioterapia de inducción basada en cisplatino, taxol y cetuximab y que alcanzaban respuesta completa, completaban dosis bajas de radioterapia modulada (IMRT) (dosis de 54 Gy in 27 fracciones) de forma concomitante con cetuximab, o radioterapia con dosis estándar (69.3 Gy in 33 fracciones) y cetuximab si presentaban respuesta parcial o enfermedad estable. En este estudio, la SLP al año fue del 91% para el grupo de IMRT y del 87% para la radioterapia estándar (289). Los resultados definitivos de éstos y otros estudios son esenciales para establecer si los beneficios observados en SLP y SG con desintensificación del tratamiento con radioterapia, el uso de radioterapia en monoterapia, o el uso de fármacos menos tóxicos, son mantenidos a largo plazo y pueden llegar a implantarse para el tratamiento de este subgrupo de pacientes.

Otro aspecto que se requiere analizar en detalle es la determinación del impacto pronóstico de otros subtipos de HPV de alto riesgo (no HPV-16). Confirmar si los otros subtipos de HPV tienen un impacto similar al de los HPV-16, puede tener importantes implicaciones en el abordaje terapéutico de ese subgrupo. Diferentes reportes retrospectivos han reportado una menor SG para subtipos de HPV de alto riesgo diferentes al HPV-16. Así, un estudio demostró como la SG a los 3 años para los HPV-16 era del 88% comparado con el 49% de los subtipos no HPV-16 (179). De forma similar, otro estudio demostró una SG a los 5 años del 65% para los tumores de orofaringe HPV-16 comparado un 46% para otros subtipos de HPV, sugiriendo estos datos que las estrategias de desintensificación quizás no sean apropiadas para todos los subtipos de HPV (290-292). De forma paralela, diferentes estudios están evaluando la eficacia de sustituir el tratamiento estándar de cisplatino por cetuximab como

tratamiento concomitante a la radioterapia en pacientes con tumores de orofaringe HPV positivos, con la finalidad de disminuir la tasa de complicaciones a largo plazos relacionada con el tratamiento de quimioterapia de altas dosis, y manteniendo la eficacia. Sin embargo, diferentes subanálisis retrospectivos que han analizado el impacto del estatus de HPV en los estudios clínicos de concomitancia con terapias anti-EGFR no han demostrado una clara asociación entre positividad para HPV y mayor beneficio con este abordaje (134, 293), sugiriéndose como hipótesis la falta de correlación entre sobreexpresión de EGFR y estatus de HPV en tumores de cabeza y cuello (294, 295). Por tanto, se requiere más información respecto al impacto del HPV en pacientes tratados con terapias anti-EGFR.

Como se ha discutido, el tratamiento de los tumores de cabeza y cuello, y en concreto el de los tumores HPV positivos requiere de un abordaje multidisciplinar que se asocia a la utilización de diferentes tratamientos que implican una morbilidad significativa, lo cual es muy relevante al tratarse de un subgrupo de pacientes habitualmente jóvenes y con excelente pronóstico a largo plazo. Al igual que se están desarrollando nuevas estrategias de tratamiento con radioterapia y quimioterapia, también se han implementado mejoras en las técnicas quirúrgicas, y en concreto el abordaje transoral, ha supuesto una nueva opción de tratamiento para los pacientes con tumores de orofaringe (296). Así, la cirugía robótica transoral fue aprobada por la agencia Americana del medicamento en 2009 para el tratamiento de los pacientes con tumores de orofaringe en estadios iniciales (T1-T2). Sin embargo, a pesar de éste avance, la gran mayoría de los pacientes aún necesitarán completar radioterapia y/o quimioterapia complementaria (297). Estudios retrospectivos también han sugerido beneficio en SG de los tratamientos complementarios de radioterapia y quimioterapia en pacientes HPV positivos (298), aunque el beneficio en pacientes con afectación ganglionar extracapsular parece ser más limitado (299). En la actualidad se está analizando el impacto de los tratamientos complementarios a la cirugía en pacientes HPV positivos en diferentes estudios clínicos, así como valorando el impacto de los factores patológicos pronósticos clásicos en este subgrupo de pacientes.

## 2. Justificación del trabajo

El tratamiento estándar de los pacientes con tumores de cabeza y cuello localmente avanzados e irresecables se considera el tratamiento concomitante de quimioterapia, con altas dosis de cisplatino y radioterapia, sin embargo este tratamiento se asocia a una elevada toxicidad, tanto aguda como tardía, y con unos resultados oncológicos limitados, ya que la SG a los 5 años se estima inferior al 40% (104, 115, 277). Diferentes estrategias terapéuticas se han desarrollado para intentar minimizar la toxicidad del tratamiento estándar, como es el uso combinado de agentes anti-EGFR con radioterapia. Esta estrategia se considera una de las alternativas estándar para pacientes no tributarios de realizar el tratamiento concomitante con quimioterapias basadas en platino, ya sea por edad, comorbilidades u otros motivos (300). A pesar de la disminución en la incidencia de los tumores de cabeza y cuello en la última década, la incidencia de los tumores relacionados a la infección del HPV ha aumentado, principalmente en pacientes jóvenes, con tumores de orofaringe y no expuestos a los factores de riesgo clásicos como el tabaco y alcohol. La infección por HPV, y en concreto HPV-16, implicado en la etiología de la mayoría de los casos de tumores orofaríngeos, se considera el factor pronóstico independiente más importante junto con el hábito tabáquico, en tumores localmente avanzados de orofaringe. Sin embargo el impacto pronóstico de la infección por HPV en otras localizaciones, como cavidad oral, o el impacto de otros genotipos de virales no HPV-16, no están claramente establecido (124).

Durante los últimos años, se están desarrollando diferentes estrategias terapéuticas focalizadas en mejorar el ratio beneficio/toxicidad en el subgrupo de pacientes HPV positivos, sin embargo actualmente, fuera de ensayo clínico, el abordaje terapéutico para este subgrupo no se modifica. Con la finalidad de poder conseguir adaptar un tratamiento individualizado a los pacientes con tumores HPV positivos, además de los avances en nuevas técnicas quirúrgicas, de radioterapia o el desarrollo de nuevos fármacos, resulta crucial establecer de forma clara el impacto pronóstico de la positividad para HPV en los tumores de orofaringe tratados con cada uno de los diferentes abordajes terapéuticos, como el tratamiento concomitante de

quimioradioterapia, el tratamiento concomitante con terapia anti-EGFR y la quimioterapia de inducción. De forma similar, determinar el impacto de HPV en tumores de cabeza y cuello de otras localizaciones anatómicas, como en los tumores de cavidad oral, así como aportar evidencia del impacto de los diferentes subtipos virales, es relevante y puede ayudar a individualizar el tratamiento de estos pacientes. Nuestro estudio, además de aportar evidencia respecto a éstas preguntas, también pretende determinar la utilidad de diferentes métodos diagnósticos para el HPV. A pesar de que los métodos de detección del genoma viral de HPV se consideran estándar, en los últimos años el uso de inmunohistoquímica de p16 se ha implementado como marcador surrogado de infección por HPV. Sin embargo, tanto la correlación de los dos métodos diagnósticos, como el impacto pronóstico de IHC-p16 en tumores de orofaringe u otras localizaciones tumorales y los tratamientos realizados está aún por establecer.

En los últimos años se ha profundizado en la identificación de subgrupos pronósticos de pacientes con tumores de cabeza y cuello, con especial interés en los pacientes HPV positivos, con el objetivo final de poder diseñar estrategias de tratamiento variables en función del riesgo de recurrencia. Basándonos en diversos factores clínicos, como la positividad de para HPV, el estadio de la afectación tumoral primaria y ganglionar y el hábito tabáquico, hemos sido capaces de establecer tres grupos de riesgo de recurrencia en tumores de orofaringe tratados con quimioradioterapia (166). Sin embargo, y a pesar de los grandes avances realizados en el conocimiento de las diferencias moleculares de los tumores HPV positivos y negativos, aún no se ha podido establecer de forma clara, diferentes grupos moleculares pronósticos con aplicabilidad clínica en los tumores de orofaringe y cavidad oral (111, 113, 146, 206, 266). La identificación de grupos moleculares pronósticos, puede además tener importantes implicaciones terapéuticas, ya que podría favorecer la identificación de los pacientes con peor y mejor pronóstico, lo que determinaría qué pacientes requerirían completar un tratamiento más o menos agresivo, y por tanto asociado a mayor o menor toxicidad secundaria. Además dicha clasificación biológica ayudaría a la determinación de biomarcadores predictivos de respuesta a diferentes terapias dirigidas, actualmente limitadas para el tratamiento de éstos tumores (221, 246, 247, 249, 257, 301, 302). Los estudios de expresión génica realizados hasta la fecha han descrito como los tumores de cabeza y cuello, en concreto los subgrupos genómicos basal, mesenquimal y clásico, se correlacionan y comparten similitudes biológicas con los

subtipos basal y clásico de cáncer de mama y pulmón (248). Diferentes plataformas de expresión génica, como la plataforma PAM50, ampliamente utilizada en cáncer de mama (303, 304), han demostrado su utilidad en clasificar subtipos moleculares asociados a un comportamiento clínico diferente, y a su vez, aportar una valiosa información pronóstica. La misma plataforma PAM50 ha sido utilizada para analizar las similitudes en el perfil de expresión génica entre tumores de diferentes localizaciones primarias. Estos estudios, han demostrado como el subtipo tumoral “basal-like” identificado primariamente en tumores de mama por la plataforma PAM50, también se identificaría en tumores escamosos de pulmón, sugiriendo todo ello que una misma estrategia terapéutica se podría desarrollar en diferentes tumores, pero que comparten similitudes biológicas (305). En nuestro estudio evaluaremos la utilidad clínica de los genes incluidos en la plataforma de expresión génica PAM50 para aportar información pronóstica en tumores de orofaringe y cavidad oral localmente avanzados tratados con tratamiento curativo.

Por tanto, en nuestro estudio intentaremos determinar el impacto pronóstico de la infección por HPV en pacientes diagnosticados de tumores localmente avanzados e irresecables de orofaringe y cavidad oral, tratados con quimioradioterapia de forma concomitante en nuestro medio, así como investigar de forma exploratoria el impacto del estatus de HPV en los pacientes tratados con terapia anti-EGFR y radioterapia y aquellos tratados con quimioterapia de inducción. De forma paralela, determinaremos la utilidad de los perfiles de expresión genómica para identificar grupos tumorales pronósticos, así como describir las posibles diferencias genómicas entre los tumores HPV positivos y negativos, así como las diferencias entre los tumores de cavidad oral y orofaringe.

# 3. Hipótesis

## 3.1 Hipótesis principales

- La hipótesis principal de nuestro estudio es confirmar el impacto pronóstico del estatus de HPV en pacientes diagnosticados de tumores de orofaringe y cavidad oral, localmente avanzados e irresecables, tratados con tratamiento radical basado en quimioradioterapia, quimioterapia de inducción o terapia anti-EGFR y radioterapia.

## 3.2 Hipótesis secundarias:

1. El estudio de IHC-p16 como marcador surrogado de infección por HPV es pronóstico en pacientes diagnosticados de tumores de orofaringe y cavidad oral, localmente avanzados e irresecables, que han sido tratados con tratamiento radical basado en quimioradioterapia, quimioterapia de inducción o terapia anti-EGFR y radioterapia.
2. El uso de perfiles de expresión génica es útil a la hora de diferenciar los subgrupos pronósticos entre los pacientes con tumores de orofaringe y cavidad oral localmente avanzados estudiados en nuestra población.
3. El uso de perfiles de expresión génica permite identificar diferencias genómicas en función de la localización tumoral (tumores de orofaringe y cavidad oral) y del estatus de HPV (HPV positivos y negativos).
4. Las técnicas de IHC p16 y secuenciación de DNA viral tienen una correlación óptima en cuanto a la detección del estatus de HPV en pacientes con tumores de orofaringe y cavidad oral localmente avanzados.



## 4. Objetivos

### 4.1 *Objetivos principales:*

- Determinar la implicación pronóstica del HPV en pacientes diagnosticados de tumores de orofaringe y cavidad oral, localmente avanzados e irresecables, que han sido tratados con tratamiento radical basado en quimioradioterapia, quimioterapia de inducción o terapia anti-EGFR y radioterapia.

### 4.2 *Objetivos secundarios*

- Determinar la implicación pronóstica de p16 como marcador surrogado de infección por HPV en pacientes diagnosticados de tumores de orofaringe y cavidad oral, localmente avanzados e irresecables, que han sido tratados con tratamiento radical basado en quimioradioterapia, quimioterapia de inducción o terapia anti-EGFR y radioterapia.
- Determinar la utilidad de análisis de expresión génica a la hora de identificar y caracterizar subtipos moleculares pronósticos de pacientes diagnósticos de tumores de orofaringe y cavidad oral localmente avanzados e irresecables tratados con tratamiento radical basado en quimioradioterapia, quimioterapia de inducción o terapia anti-EGFR y radioterapia.
- Determinar la utilidad de los análisis de perfiles de expresión génica a la hora de determinar las diferencias genómicas asociadas a los tumores de orofaringe y cavidad oral y a los tumores HPV positivos y negativos.
- Determinar la correlación de las técnicas de IHC p16 y secuenciación de DNA viral en pacientes con tumores de orofaringe y cavidad oral localmente avanzados e irresecables analizados en nuestro estudio.

## **5. Métodos**

### ***5.1 Tipo de estudio***

El estudio realizado consiste en un estudio retrospectivo con recogida de características clínicas y análisis genómicos asociados, para el que se obtuvo la autorización del Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona, como proyecto de investigación PR(AG)267/2013, con fecha del 01/10/2013.

### ***5.2 Selección de la muestra y variables***

Se seleccionaron los pacientes diagnosticados de tumores escamosos de orofaringe y cavidad oral localmente avanzados (estadios III y IV), considerados irresecables, que han completado tratamiento con quimioradioterapia, quimioterapia de inducción o terapia anti-EGFR y radioterapia con intención curativa en el Hospital Vall d'Hebron entre los años 2000-2011. En este subgrupo de pacientes se llevó a cabo la revisión de la historia clínica, incluyendo la anotación de factores clínicos y patológicos reconocidos como pronósticos: hábitos tóxicos, ECOG/performance status al inicio del tratamiento, estatus HPV si disponible, estadio clínico y radiológico (TC o RMN y PET). Asimismo, se han registrado tanto los tratamientos realizados como sus características, así como la respuesta al tratamiento basado en criterios RECIST versión 1.1. Todos los pacientes han realizado seguimiento clínico y radiológico en nuestro centro y se ha registrado la fecha de recurrencia, diferenciando entre recurrencia local o a distancia, cirugía de rescate, vaciamiento ganglionar, y aparición de 2º tumor primario, pérdida de seguimiento o muerte. La aparición de un segundo tumor primario en el área de cabeza y cuello, se ha definido como aparición de 2º tumor a una distancia mayor de 2 cm de tumor primario original y con más de 3 años de diferencia desde el tratamiento primario. Las muestras tumorales para los análisis de estatus de HPV y perfiles de expresión génica se corresponden a las biopsias pretratamiento de los pacientes previamente identificados.

## **5.3 Análisis de HPV**

### **5.3.1 Estudio de HPV mediante PCR**

Los análisis del estatus de HPV dentro de este estudio se han llevado a cabo en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Las muestras tumorales pretratamiento de los pacientes seleccionados, una vez incluidas en parafina (FFPE) y seccionadas, han sido analizadas el equipo de anatomía patológica determinando la calidad e idoneidad de la muestra tumoral, y seleccionando la región con mayor contenido tumoral para poder completar el diagnóstico de infección por HPV (IHC y PCR). De forma paralela se ha llevado a cabo la extracción de RNA para los análisis de expresión génica.

Los estudios de DNA viral se han realizado mediante la amplificación de un fragmento común de los HPV y posterior secuenciación directa de los casos que resultan amplificados. Para ello se ha procedido a la extracción de DNA de las diferentes muestras en parafina siguiendo las instrucciones del Kit de extracción del DNA de Qiagen (DNA EZ1Tissue Kit) y con la ayuda de un extractor semiautomático de DNA EZ1. Posteriormente, se ha secuenciado el DNA mediante espectrofotometría con el uso de nanodrop, amplificándose mediante PCR usando los primers GP5-GP6:

Primer GP5: TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC

Primer GP6: GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC

A continuación se ha realizado el genotipado de HPV mediante identificación genómica para diagnóstico “in vitro” que permite determinar el subtipo específico de HPV de los 17 subtipos de alto riesgo (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73 y 82) y de los 16 subtipos de bajo riesgo (6, 11, 40/61, 42, 43/ 44, 54/55, 70, 57/71, 72, 81, y 84/26).

### **5.3.2 Estudio de HPV mediante Inmunohistoquímica de p16**

El análisis de IHC de p16INK4a (IHC-p16) se ha realizado con el anticuerpo DAKO Cyt (OA315). Se ha considerado p16 sobreexpresada cuando el resultado de la tinción es positiva de manera difusa, no parcheada, en más del 70% de la celularidad maligna o una positividad difusa en células basales y parabasales en el caso de los escamosos bien diferenciados. Se considera ausencia de sobreexpresión la positividad irregular o parcheada.

## **5.4 Análisis genómicos**

### **5.4.1 Estudios expresión génica mediante la plataforma PAM50 y correlación pronóstica**

Los análisis de expresión génica integrados en este estudio se han realizado en el laboratorio de genómica translacional del Instituto Oncológico Vall d'Hebron (VHIO). Para la realización de los análisis, las muestras de tejido tumoral previamente seleccionadas y fijadas en parafina han sido cortadas (2-3 cortes de 10um por muestra) en el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario Vall d'Hebron. Posteriormente se ha purificado el RNA (mínimo 100 ng por muestra) y mediante la plataforma nCounter de Nanostring Technologies se han llevado a cabo los análisis. Mediante esta plataforma diferentes sondas marcadas con códigos de barras fluorescentes son creadas para cada gen y se dejan en hibridación con RNAs de tejidos en parafina o tejido fresco. Tras la hibridación, las moléculas de RNA y sus sondas son literalmente contadas. Por lo tanto, esta tecnología ofrece la ventaja de no requerir ninguna amplificación, reacción enzimática o manipulación, y únicamente requiere del contado digital de lo RNAs en la muestra, que se realiza en 48 horas. La tecnología Nanostring permite realizar este tipo estudios de expresión génica con una cantidad de RNA inferior a la necesitada para realizar análisis de qRT-PCR (100ng vs. 600ng), permite analizar diferentes genes de forma simultánea y con la misma cantidad de material tumoral, no requiere aislamiento de RNA (únicamente requiere la lisis del

tejido parafinado) y por último el coste por gen analizado es aproximadamente un 50% inferior a la plataforma qRT-PCR.

Los datos de expresión génica se han normalizado utilizando 5 genes housekeeping (ACTB, MRPL19, PSMC4, RPLP0 y SF3A1) anteriormente testados por otro datasets. Para identificar los subtipos intrínsecos de cáncer de mama en nuestro set de tumores (Luminal A, Luminal B, Her2-enriched, Basal-like y Normal-like), hemos usado el *PAM50 intrinsic subtype classifier* después de centrar (median centering) los genes de nuestro conjunto de datos con el conjunto de datos de cáncer de mama. Una vez realizados los análisis de expresión génica se ha analizado la asociación de cada gen incluido en la plataforma PAM50, además de 5 genes adicionales (AR; CD8A, PDCD1 o PD1 y CD274 (PDL-1) y 5 genes control (ACTB, MRPL19, PSMC4, RPLP0 y SF3A1) con la SG y SLP de los pacientes, así como se han determinado los genes estadísticamente más significativos para SG y SLP (p value marginales). Además, se ha analizado la distribución de los genes del PAM50 en relación a la localización tumoral primaria (orofaringe vs cavidad oral) y el estatus de HPV (HPV positivos y negativos).

#### **5.4.2 Validación de los resultados de expresión génica mediante PAM50 en la base de datos del TCGA de tumores de cabeza y cuello.**

Una vez realizados los estudios de expresión génica en nuestra cohorte de tumores de cavidad oral y orofaringe, se ha correlacionado nuestros hallazgos con los datos de expresión genómica reportado por el TCGA de tumores de cabeza y cuello. El portal cBioPortal <http://www.cbioportal.org/public-portal/>, fue usado para acceder a los datos de expresión génica del TCGA mRNA de cabeza y cuello, además de acceder a los datos de SG en función de la localización tumoral, estadio y estatus de HPV. Posteriormente se procedió a determinar la correlación entre los genes del PAM50 y los grupos pronósticos identificados en nuestra cohorte de pacientes, con los datos del TCGA a modo de validación de nuestros resultados (221).

#### **5.5. Estadística**

En nuestro estudio hemos utilizado el test exacto de Fisher y la prueba t de Student para analizar las diferencias basales entre los grupos de los pacientes HPV

positivos y negativos, dependiendo si las variables son cualitativas o cuantitativas, respectivamente. El análisis de supervivencia se realiza mediante el método de Kaplan-Meier, utilizando el log-rank test para las comparaciones estadísticas. El modelo de Cox con riesgos proporcionales es utilizado para la obtención de las hazard ratio (HR) con un intervalo de confianza del 95%. La SG se define como el tiempo desde el primer diagnóstico hasta la muerte por cualquier causa, mientras que SLP se define como el tiempo desde el primer tratamiento hasta el la primera documentación de recurrencia, segundo tumor primario o muerte por cualquier causa. Las muertes por otras causas no tumorales o pacientes con pérdida de seguimiento serán censurados.

En cuanto a los datos genómicos, a la hora de identificar los genes y/o firmas cuya expresión se asocia significativamente con la localización tumoral y el estatus HPV se utilizó la técnica Significant Analysis de Microarrays (SAM, unpaired two-class). Para corregir el valor P, dado las múltiples comparaciones que realizamos, utilizamos la False Discovery Rate ( $FDR < 5\%$ ) del paquete SAM. Los datos estadísticos se realizarán mediante código R 3.2.2 ([www.r-project.org/](http://www.r-project.org/)).

## 6. Resultados

### *6.1 Características basales de la población global a estudio*

Un total de 83 pacientes diagnosticados de tumores cavidad oral y orofaringe localmente avanzados e irresecables, estadio III y IV, tratados con la combinación de quimiorradioterapia o anti-EGFR y radioterapia en el Hospital Universitario Vall d'Hebrón entre los años 2000-2011 fueron seleccionados. Las características demográficas y tumorales en función de la localización tumoral se muestran en la tabla 3. Del total de 83 pacientes, 44 (53%) fueron tumores de cavidad oral y 39 (47%) con tumores de orofaringe. La mayoría de los pacientes era hombres (81%), con antecedente de exposición al tabaco (77%), con un 48% de hábito alcohólico. La mayoría de los pacientes era estadios IV (n=66, 79.5%) con estadios ganglionares N2/N3 (53%). Globalmente, las características clínicas y tumorales entre las dos poblaciones (cavidad oral y orofaringe) estaban correctamente balanceadas, siendo únicamente la edad de los pacientes con tumores de orofaringe significativamente inferior a la de los pacientes con tumores de cavidad oral (media 55 años vs 60 años,  $p=0.04$ ). Un total de 68 (82%) pacientes, realizaron tratamiento con quimiorradioterapia (la mayoría de ellos tratados con cisplatino, siendo 36 tumores de cavidad oral y 32 tumores de orofaringe), 9 (11%) pacientes realizaron tratamiento secuencial (5 de ellos diagnosticados de tumores de orofaringe, dos de ellos HPV-PCR positivos) y un total de 6 (7%) pacientes realizaron tratamiento con cetuximab-radioterapia (5 pacientes con diagnóstico de tumores de cavidad oral, ninguno HPV positivo).

**Tabla 3. Características demográficas en función de la localización tumoral.**

	Localización Tumoral		Total (n=83)	P value
	Cavidad Oral (n=44)	Orofaringe (n=39)		
<b>Edad (años)</b> <b>Media (rango)</b>	60.2 (38.3 – 80)	55 (33.9 – 73.7)	57.8 (33.9 – 80)	0.04
<b>Sexo</b>				
<b>Mujer</b>	10	6	16	0.42
<b>Hombre</b>	34	33	67	
<b>ECOG/Performance Status</b>				
<b>0</b>	15	18	33	0.37
<b>1</b>	28	21	49	
<b>2</b>	1	0	1	
<b>Tabaco</b>				
<b>No fumador</b>	9	4	13	0.45
<b>&lt;10 paquete/año</b>	8	9	17	
<b>≥ 10 paquete/año</b>	23	22	45	
<b>Alcohol</b>				
<b>No</b>	21	12	33	0.5
<b>Si</b>	14	13	27	
<b>Ex bebedor</b>	6	7	13	
<b>Estadío Tumor</b>				
<b>Primario</b>				
<b>T1-T2</b>	6	6	12	1
<b>T3-T4</b>	38	33	71	
<b>Estadío Ganglionar</b>				
<b>N 0-1</b>	21	18	39	1
<b>N 2-3</b>	23	21	44	
<b>Estadío</b>				
<b>III</b>	8	9	17	0.6
<b>IV</b>	36	30	66	
<b>Terapia</b>				
<b>QT-RT</b>	36	32	68	0.77
<b>QT secuencial</b>	4	5	9	
<b>Cetuximab-RT</b>	4	2	6	
<b>Dosis de RT</b>				
<b>&lt;70 Gy</b>	7	6	13	1
<b>≥70 Gy</b>	37	33	70	
<b>Respuesta.</b>				
<b>RC</b>	25	32	57	0.06
<b>RP</b>	12	5	17	
<b>EE</b>	1	0	1	
<b>PR</b>	6	2	8	

Abreviaciones: HPV: Virus Papiloma Humano; n: Numero de pacientes; QTRT: Quimioradioterapia; RT: Radioterapia RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EE: enfermedad estable; PR: progresión tumoral



## ***6.2 Resultados de estudios de HPV en la población global a estudio***

El estatus de HPV por PCR se pudo analizar en 81 (98%) pacientes, siendo 16 (19.2%, 16/83) positivos. Entre los tumores positivos por PCR, un 69% (11/16) eran pacientes con tumores de orofaringe y 31% (5/16) tumores de cavidad oral. Entre los 39 pacientes con tumores de orofaringe testados para HPV-PCR, la positividad fue del 28% (11/39), mientras que para los 44 pacientes con tumores de cavidad oral la positividad fue del 12% (5/42). La mayoría de los pacientes presentaban HPV-16, excepto un paciente con tumor de orofaringe HPV-45, un paciente con tumor de cavidad oral y HPV-61, y otro paciente con tumor de orofaringe en el que se encontró positividad para HPV-16 y HPV-42.

Respecto a la positividad por IHC-p16, se pudo analizar en un total de 81 (98%) pacientes, siendo positivo en el 18% (15/83), de los que un 73% (11/15) correspondía a pacientes con tumores de orofaringe y un 27% (4/15) a tumores de cavidad oral. Entre los 39 pacientes con tumores de orofaringe, la positividad fue del 28.2% (11/39), mientras que para los 44 pacientes con tumores de cavidad oral la positividad fue del 9% (4/44). La determinación de los dos métodos diagnósticos de HPV (PCR/IHC p16) se pudo realizar en un total de 80 pacientes (96%) pacientes. De estos, un total de 4 pacientes (5%, 4/80) IHC-p16 negativos resultaron HPV positivo (3 cavidad oral, 1 orofaringe). Además, un total de 4 pacientes (5%, 4/80) que IHC-p16 positivos no mostraron positividad para HPV (2 cavidad oral, 2 orofaringe). En 1 paciente con tumor de cavidad oral no se pudo realizar los estudios de HPV-PCR ni IHC-IHC (figura 8). Globalmente, la concordancia de ambos tests, cuando se comparaba IHC-p16 con el test gold-estándar de PCR, fue del 0.9 (95% CI 0.81-0.95,  $p=0.02$ ), con un índice de Kappa de 0.67. Al analizar la concordancia de ambos test, en función de la localización tumoral, dicha concordancia era significativamente mejor en los tumores de orofaringe comparado con tumores de cavidad oral, estando relacionado con la baja especificidad de IHC-p16 comparada con el gold-estándar PCR en cavidad oral. Así, en tumores de orofaringe, la concordancia fue del 0.92 (95% CI 0.78-0.98,  $p=0.004$ ), con índice de Kappa de 0.802, una sensibilidad del 92% y una especificidad del 90%. Sin embargo en tumores de cavidad oral la concordancia fue del 0.88 (95% CI 0.74-0.96,  $p=0.61$ ) y con índice de Kappa de 0.378, una sensibilidad del 94% y una especificidad del 40%.

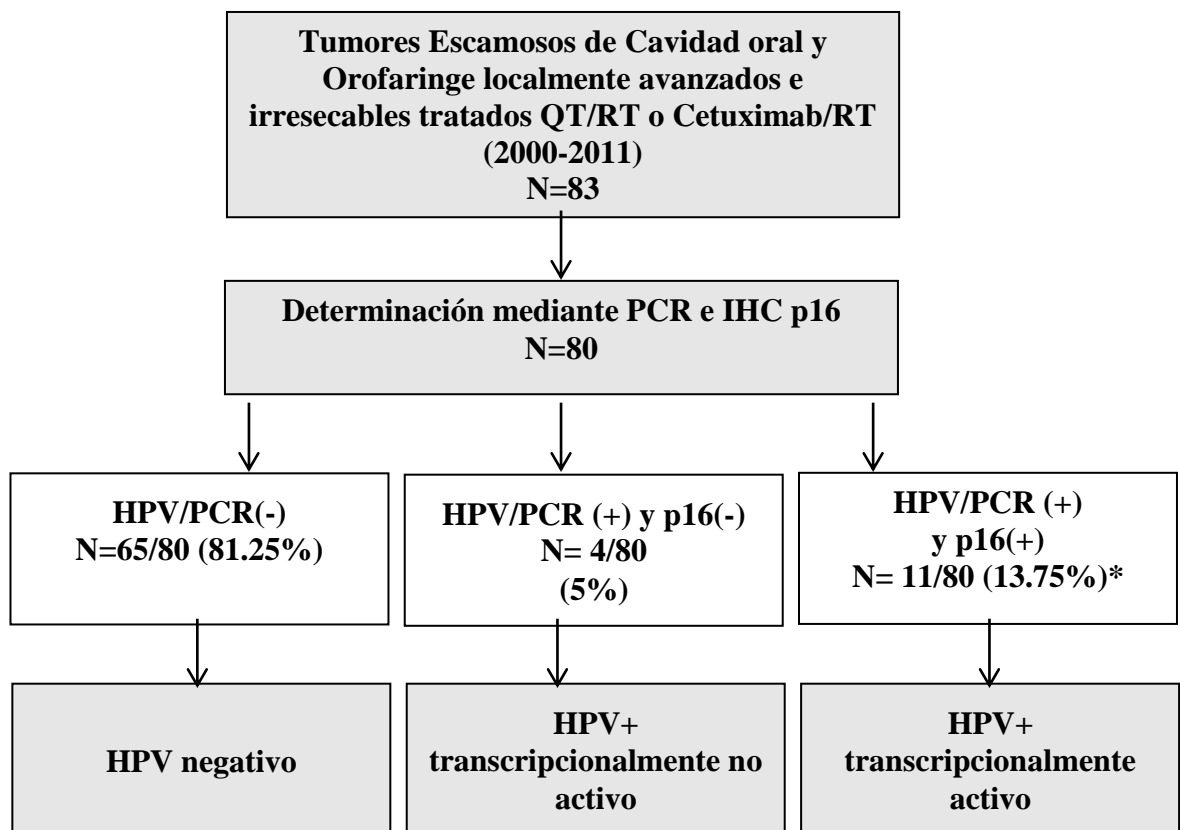
Las características demográficas y tumorales en función del estatus de HPV (DNA PCR y IHC-p16) se muestran en la tabla 4. Globalmente, los subgrupos HPV positivos y negativos compartían características similares, con la excepción de la mayor frecuencia de tumores HPV positivos en orofaringe comparado con cavidad oral ( $p=0.04$ ).

**Tabla 4. Características demográficas y tumorales en función del estatus de HPV.**

	HPV			<i>P value</i>
	Positivos PCR (n=16)	Positivos P16 (n=15)	Negativos (PCR/DNA - /p16-) (n=61)	
<b>Edad (años)</b> <b>Media (rango)</b>	57.8 (40.3 – 78.5)	56.9 (40.3 – 78.5)	58 (33.9 – 80)	0.87
<b>Sexo</b>				
<b>Mujer</b>	4	4	11	0.59
<b>Hombre</b>	12	11	50	
<b>ECOG/Performance Status</b>				
<b>0</b>	9	7	23	0.62
<b>1</b>	7	8	37	
<b>2</b>	0	0	1	
<b>Tabaco</b>				
<b>No fumador</b>	2	2	10	0.96
<b>&lt;10 paquete/año</b>	3	4	12	
<b>≥ 10 paquete/año</b>	8	7	34	
<b>Alcohol</b>				
<b>No</b>	5	3	27	0.48
<b>Si</b>	5	7	17	
<b>Ex bebedor</b>	2	2	11	
<b>Localizacion Tumor</b>				
<b>Orofaringe</b>	11	11	26	0.04
<b>Cavidad Oral</b>	5	4	35	
<b>Estadio Tumor</b>				
<b>Primario</b>				1
<b>T1-T2</b>	2	2	8	
<b>T3-T4</b>	14	13	53	
<b>Estadio Ganglionar</b>				
<b>N 0-1</b>	7	6	30	0.82
<b>N 2-3</b>	9	9	31	
<b>Estadio</b>				
<b>III</b>	2	2	14	0.58
<b>IV</b>	14	13	47	
<b>Terapia</b>				
<b>QT-RT</b>	14	14	48	0.65

	HPV			<i>P value</i>
	Positivos PCR (n=16)	Positivos P16 (n=15)	Negativos (PCR/DNA - /p16-) (n=61)	
<b>QT secuencial Cetuximab-RT</b>	2 0	1 0	7 6	
<b>Dosis de RT</b>				
<70 Gy	1	2	11	0.57
≥70 Gy	15	13	50	
<b>Respuesta tratamiento</b>				
RC	15	14	37	0.07
RP	1	1	15	
EE	0	0	1	
PR	0	0	8	

HPV: Virus Papiloma Humano; n: Numero de pacientes; QTRT: Quimiorradioterapia; RT: Radioterapia RC: respuesta completa; RP: respuesta parcial; EE: enfermedad estable; PR: progresión tumoral



**Figura 8: Secuencia del estudio de HPV.** En un total de 80 pacientes individuales se pudo realizar las dos determinaciones de HPV (PCR/IHC p16).\*Un paciente con tumor de cavidad oral no se pudo realizar estudios de HPV (ni PCR ni IHC-p16) y un paciente IHC-p16 desconocido resulto HPV-PCR positivo.

### **6.3 Resultados de eficacia**

#### **6.3.1 Resultados de eficacia en la población global en función de la tasa de respuestas, riesgo de recurrencia y supervivencia global.**

En nuestro estudio, con un seguimiento medio desde el final del tratamiento de 6.4 años (3.9-12 años), se observaron un total de 41 (49.3%) recurrencias tumor primario original (29, 70.74% recurrencias locoregionales, 6, 14.63% a distancia del tumor primario original y 6, 14.63% pacientes con recurrencia local y a distancia simultanea). Además, un total de 12 (14.45%) pacientes presentaron un segundo tumor primario de cabeza y cuello.

La tasa de respuestas completas tras la finalización del tratamiento fue del 69%, siendo del 82% para tumores de orofaringe y 57% para tumores de cavidad oral ( $p=0.02$ ). La SG a los 5 años y la SLP a los 3 años de la población global del estudio fueron 40% y 47% respectivamente. La SG de los pacientes con tumores de orofaringe y cavidad oral fue 42% y 38% respectivamente, sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas. Así mismo, la SLP de los pacientes con tumores de orofaringe y cavidad oral fue 51% y 43% respectivamente, sin objetivarse diferencias estadísticamente significativas.

En nuestro estudio realizamos análisis univariados y multivariados ajustados por variables como: sexo (mujer vs hombre), estadiaje tumoral primario (T1-2 vs T3-T4), estadiaje tumoral ganglionar (N0-1 vs N2-3), estadiaje tumoral (III vs IV), localización tumoral (cavidad oral vs orofaringe) performance estatus (0 vs 1-2), Edad ( $<65$  vs  $\geq 65$ ) (habito tabáquico previo ( $<10$  paquete/año  $\geq 10$  paquete/año), tratamiento completado (QTRT vs inducción vs anti-EGFR-RT) y HPV estatus (positivo vs negativo) (tabla 5). En la población global, la positividad para HPV, tanto por PCR como IHC- p16) resultaron factores pronósticos independientes para SLP y SG. Así, para HPV-PCR el beneficio en SLP y SG se observó con una HR 0.18 (95% CI 0.04 –0.07,  $p=0.01$ ) y HR 0.24 (95% CI 0.07–0.9,  $p=0.03$ ) respectivamente, mientras que la IHC-p16 demostró una HR 0.09 (95% CI 0.02-0.045,  $p<0.01$ ) y HR 0.14 (95% CI 0.03-0.064,  $p=0.01$ ) para SLP y SG. Otros factores asociados estadísticamente a peor pronóstico en la población

global, identificados en nuestro estudio fueron: Estadio T3-T4 (SLP HR 6.18,  $p < 0.001$ ; SG 2.42,  $p < 0.001$ ), Estadios IV (SLP HR 0.18,  $p < 0.001$ ; SG HR 0.17,  $p < 0.01$ ) y el tratamiento concomitante con cetuximab-radioterapia (SLP HR 24.65,  $p < 0.001$ ; SG HR 13.14,  $p < 0.001$ , sin embargo el número de pacientes que completaron tratamientos secuenciales o anti-EGFR-RT son limitados. De forma relevante, la SG a los 5 años para los pacientes que completaron QTRT fue del 44% comparado con 33% del tratamiento secuencial y 0% del tratamiento anti-EGFR-RT.



	SLP				SG			
	Univariado		Multivariado		Univariado		Multivariado	
	HR	P	HR	P	HR	P	HR	P
HPV+ (HPV-)	0.38 (0.16 – 0.89)	<b>0.02</b>	0.16 (0.04 – 0.6)	<b>&lt;0.01</b>	0.4 (0.17 – 0.95)	<b>0.04</b>	0.22 (0.06 – 0.8)	<b>0.02</b>
P16+ (p16-)	0.3 (0.12 – 0.76)	<b>0.01</b>	0.13 (0.03 – 0.49)	<b>&lt;0.01</b>	0.32 (0.12 – 0.8)	<b>0.01</b>	0.13 (0.03 – 0.49)	<b>&lt;0.01</b>
P16+ y/o HPV+ (P16- y HPV-)	0.31 (0.14 – 0.69)	<b>&lt;0.01</b>	0.17 (0.05 -0.54)	<b>&lt;0.01</b>	0.33 (0.15 – 0.75)	<b>&lt;0.01</b>	0.17 (0.05 – 0.54)	<b>&lt;0.01</b>

Abreviaciones: SLP: Supervivencia libre de progresión, SG: Supervivencia global; HPV: Virus Papiloma Humano; QTRT: Quimioradioterapia; RT: Radioterapia. T: tumor primario; N: afectación ganglionar; PS: performance status; paq: paquete

En la población global de nuestro estudio analizamos la tasa de respuestas en función del tratamiento realizado. Así para el tratamiento de quimioradioterapia concomitante, la tasa de respuestas completas y respuestas parciales fue del 72% y 19%, con el tratamiento secuencial fue del 77.8% y 22.2%, mientras que para el tratamiento con cetuximab y radioterapia fue del 16.7% y del 33.3% respectivamente, con una comparación entre los grupos significativa ( $p=0.03$ ). Al analizar la tasa de respuesta en función de la localización tumoral demostró una tasa de respuestas completas y respuestas parciales del 82.1% y del 12.8% para tumores de orofaringe, y del 56.8% y 27.3% respectivamente para tumores de cavidad oral, resultando la comparación entre todos los grupos no significativa estadísticamente ( $p=0.06$ ), que alcanza la significación estadística al comparar el global de las respuestas completas con el resto de valoraciones de respuesta ( $p=0.01$ ), favoreciendo a los tumores de orofaringe ((tablas 6 y 7).

**Tabla 6: Valoración de Respuesta en función del tratamiento realizado**

Tipo de tratamiento	Valoración de Respuesta			
	EE	PR	RC	RP
QT-RT	1 (1.5%)	5 (7.4%)	49 (72.1%)	13 (19.1%)
Cetuximab-RT	0 (0%)	3 (50%)	1 (16.7%)	2 (33.3%)
QT secuencial	0 (0%)	0 (0%)	7 (77.8%)	2 (22.2%)

Abreviaciones: QT-RT: quimioradioterapia, EE: Enfermedad Estable, PR: progresión, RC, respuesta completa, RP: repuesta parcial

**Tabla 7: Valoración de Respuesta en función de la localización tumoral**

Localización Tumoral	Valoración de Respuesta			
	EE	PR	RC	RP
Orofaringe	0 (0%)	2 (5.1%)	32 (82.1%)	5 (12.8%)
Cavidad Oral	1 (2.3%)	6 (13.6%)	25(56.8%)	12 (27.3%)

Abreviaciones: EE: Enfermedad Estable, PR: progresión, RC, respuesta completa, RP: repuesta parcial



### **6.3.2 Resultados de eficacia en función de la localización tumoral: Cavidad oral vs Orofaringe**

En nuestro estudio analizamos factores clínicos relacionados con la SLP y SG de nuestra cohorte en función de la localización tumoral. Similar a lo que ocurría en la población global, la positividad para HPV resultó pronóstica de forma independiente para SLP y SG en tumores de orofaringe (tabla 8). Así, para tumores HPV-PCR positivos el beneficio en SLP y SG se observó con una HR 0.12 (95% CI 0.02 –0.66,  $p=0.01$ ) y HR 0.18 (95% CI 0.04–0.85,  $p=0.03$ ) respectivamente. Otro factor asociado estadísticamente a peor pronóstico en tumores de orofaringe fue la realización de tratamiento concomitante con cetuximab-raditerapia (SLP HR 44.5,  $p=0.001$ ; SG HR 11.17,  $p=0.01$ ) sin embargo el número de pacientes que completaron anti-EGFR-RT era muy limitado. Para los tumores de cavidad oral, el impacto pronóstico de la positividad de HPV sólo se pudo realizar en análisis univariable, dado el limitado número de 5 pacientes HPV positivos en cavidad oral. En este estudio univariado, la tendencia pronóstica fue muy similar a lo observado en orofaringe con una SLP HR 0.45 (95% CI 0.11 –1.9,  $p=0.27$ ) y SG HR 0.50 (95% CI 0.12 –2.14,  $p=0.35$ ). Otros factores asociados estadísticamente a peor pronóstico fueron: estadios T3-T4 vs T1-T2 ( $p<0.01$ ), estadios IV vs estadios III ( $p=0.02$ ) y realización de tratamiento concomitante con cetuximab-raditerapia ( $p<0.001$ ) (tabla 9).

**Tabla 8: Análisis univariado y multivariado para SLP y SG en la población con tumores orofarínge (n=39).**

	SLP				SG			
	Univariado		Multivariado		Univariado		Multivariado	
	HR	P	HR	P	HR	P	HR	P
T3-T4 (T1-2)	1.14 (0.39 – 3.35)	0.81	3.13 (0.65–15.1)	0.15	1.66 (0.49 – 5.6)	0.41	4.36 (0.76-25.1)	0.1
N2-N3 (N0-1)	1.65 (0.72 – 3.77)	0.23	3.81 (0.99 – 14.6)	0.05	1.4 (0.6 – 3.23)	0.43	3.13 (0.82-11.96)	0.1
Estadios IV (estadios III)	1.03 (0.38 – 2.77)	0.95	0.4 (0.05 – 2.99)	0.37	0.89 (0.3 – 2.41)	0.83	0.26 (0.03-2.09)	0.2
≥ 10 paq/año (No fumador + <10 paq/año)	0.63 (0.26 -1.5)	0.3	0.3 (0.08 – 1.15)	0.08	0.76 (0.3 – 1.9)	0.56	0.38 (0.08-1.75)	0.21
QT secuencial (QTRT)	0.91 (0.27 – 3.1)	0.88	0.56 (0.15 – 2.09)	0.39	1.07 (0.31 – 3.64)	0.91	0.81 (0.22- 3)	0.75
Cetuxi RT (QTRT)	20.93 (2.87 – 152.6)	<0.01	44.5 (4.4– 450.2)	<b>0.001</b>	5.91 (1.2 – 29.1)	0.03	11.17 (1.66 – 75.5)	<b>0.01</b>
PS≥1 (PS=0)	.89 (0.46 – 2)	0.79	0.55 (0.2- 1.52)	0.25	1.02 (0.45- 2.31)	0.96	0.73 (0.25 – 2.07)	0.55
Edad≥65 años (<65 años)	1.85 (0.73 – 4.71)	0.2	1.68 (0.37 – 7.5)	0.49	2.2 (0.86 – 5.6)	0.09	2.04 (0.4 – 10.27)	0.39
Mujer (hombre)	0.88 (0.26- 2.95)	0.83	1.52 (0.2 – 11.36)	0.68	0.83 (0.25 – 2.79)	0.76	0.74 (0.12-4.61)	0.75
HPV + (HPV-)	0.35 (0.11 – 1.03)	0.05	0.12 (0.02 – 0.66)	<b>0.01</b>	0.37 (0.12 – 1.08)	0.07	0.18 (0.04 – 0.85)	<b>0.03</b>

**Tabla 9: Análisis univariado y multivariado para SLP y SG en la población con tumores cavidad oral (n=44).**

	SLP				SG			
	Univariado		Multivariado		Univariado		Multivariado	
	HR	P	HR	P	HR	P	HR	P
T3-T4 (T1-2)	2.7 (0.64 – 11.4)	0.18	21.2 (2.36 – 190)	<b>&lt;0.01</b>	2.71 (0.64 – 11.5)	0.18	15.34 (1.8 – 130)	<b>0.01</b>
N2-N3 (N0-1)	1.1 (0.52 – 2.3)	0.82	1.77 (0.39 – 7.9)	0.45	1.1 (0.52 – 2.36)	0.79	2.67 (0.57 – 12.1)	0.21
Estadios IV (estadios III)	0.67 (0.27 – 1.66)	0.39	0.11 (0.01-0.68)	<b>0.01</b>	0.75 (0.3 – 1.87)	0.54	0.13 (0.02 – 0.73)	<b>0.02</b>
≥ 10 paq/año (No fumador + <10 paq/año))	1.03 (0.46 – 2.32)	0.95	0.57 (0.13 – 2.44)	0.45	0.96 (0.42 – 2.19)	0.92	0.48 (0.11 – 2.1)	0.33
QT secuencial (QTRT)	1.42 (0.42 – 4.85)	0.57	1.94 (0.31 – 12.3)	0.48	1.46 (0.43 – 4.98)	0.53	3.22 (0.51 – 20.3)	0.21
Cetuxi RT (QTRT)	10 (2.9 – 34.5)	<0.001	28.6 (4.45 – 183)	<b>&lt;0.001</b>	8.04 (2.44 – 26.5)	<0.001	29.1 (4.38 – 192)	<b>&lt;0.001</b>
PS≥1 (PS=0)	1.23 (0.56 + 2.73)	0.61	0.81 (0.23 – 2.84)	0.74	1.39 (0.61 – 3.19)	0.43	1.38 (0.36 – 5.27)	0.63
Edad≥65 años (<65 años)	1.27 (0.6 – 2.69)	0.53	0.94 (0.27 – 3.19)	0.92	1.23 (0.57 – 2.65)	0.6	0.95 (0.25 – 3.64)	0.94
Mujer (hombre)	0.73 (0.28 – 1.93)	0.53	0.8 (0.24 – 2.7)	0.72	0.79 (0.3-2.08)	0.63	0.95 (0.28 – 3.24)	0.93
HPV + (HPV-)	<b>0.45</b> (0.11 – 1.9)	0.27	NR	NR	<b>0.5</b> (0.12 – 2.14)	0.35	NR	NR

### 6.3.3 Resultados de eficacia en función del estatus de HPV (HPV positivos PCR e IHC-p16 vs HPV negativos)

En nuestro estudio, los pacientes con tumores HPV positivos, tanto por PCR como por IHC-p16 presentaban mejor tasa de respuestas comparado con los HPV negativos. Así, la tasa de respuestas completas y parciales para tumores HPV-PCR positivos fue del 93.8% y 6.2% respectivamente comparado con 61.5% y 24.6% para tumores HPV-PCR negativos ( $p=0.1$ ), siendo significativa al agrupar respuestas completas vs resto de evaluaciones ( $p=0.01$ ). De forma similar, para tumores IHC-p16 positivos la tasa de respuestas completas y parciales fue del 93.3% y 6.4% respectivamente comparado con 62.1% y 24.2% para tumores IHC-16 negativos ( $p=0.17$ ), siendo significativa al agrupar respuestas completas vs resto de evaluaciones ( $p=0.03$ ) (tablas 10,11).

**Tabla 10. Resultados de eficacia (tipo de respuestas) en función de estatus HPV (PCR)**

HPV-PCR	Tipo de respuestas			
	EE	PR	RC	RP
<b>Negativo</b>	1 (1.5%)	8 (12.3%)	40 (61.5)	16 (24.6%)
<b>Positivo</b>	0 (0%)	0 (0%)	15 (93.8%)	1 (6.2%)

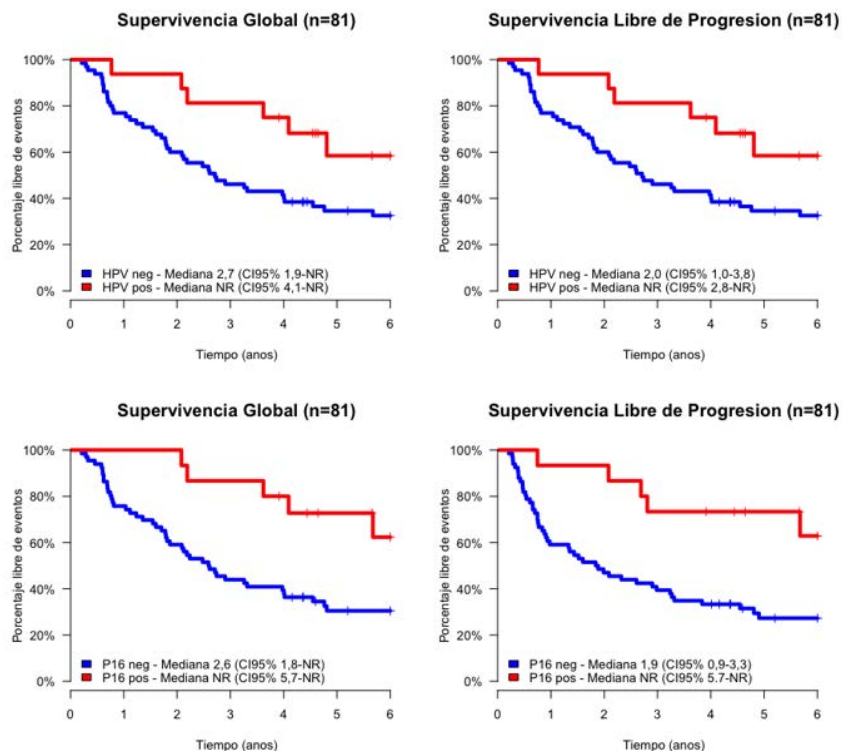
Abreviaciones: EE: Enfermedad Estable, PR: progresión, RC, respuesta completa, RP: respuesta parcial

**Tabla 11. Resultados de eficacia (tipo de respuestas) en función de estatus HPV (IHC-p16)**

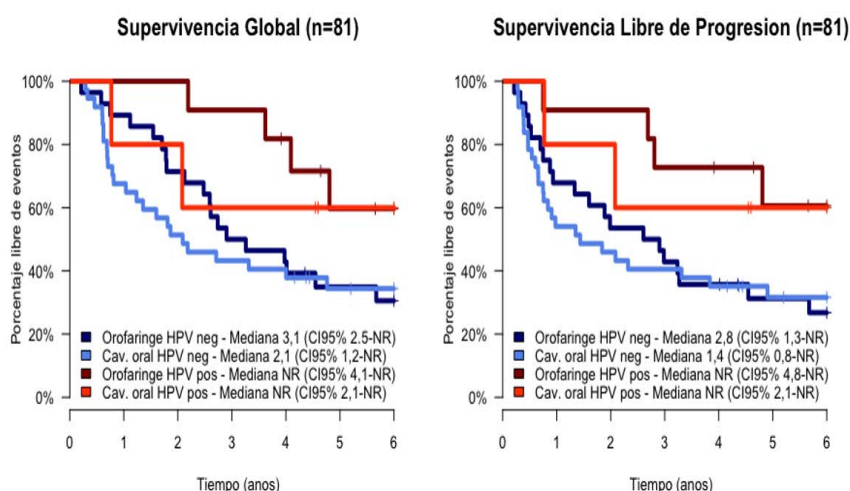
HPV IHC-p16	Tipo de respuestas			
	EE	PR	RC	RP
<b>Negativo</b>	1 (1.5%)	8 (12.1%)	41 (62.1%)	16 (24.2%)
<b>Positivo</b>	0 (0%)	0 (0%)	14 (93.3%)	1 (6.7%)

Abreviaciones: EE: Enfermedad Estable, PR: progresión, RC, respuesta completa, RP: respuesta parcial

De forma similar al beneficio en tasa de respuestas para los pacientes HPV positivos, tanto la SLP a los 3 años como la SG a los 5 años demostraron unas diferencias estadísticamente significativas. Así la SLP a los 3 años de los pacientes HPV-PCR positivos era superior a los tumores HPV negativos (81% vs 46%; HR=0.38; 95%CI 0.16 – 0.89; p=0.02), variando en función de la localización tumoral, siendo del 51% para orofaringe vs 43% para cavidad oral (HR=1.23; 95%CI 0.71 - 2.12; p=0.45). Mientras, la SG a los 5 años también favoreció a los tumores HPV-PCR positivos comparado con los tumores HPV negativos (58% vs 35%; HR=0.4; 95%CI 0.17 – 0.95; p=0.04), sin embargo este beneficio en SG dependía de los pacientes con tumores de orofaringe (60% vs 35%; HR=0.37; 95%CI (0.12 –1.08); p=0.07), al no observar diferencias significativas entre los pacientes con tumores de cavidad (60% vs 34%; HR=0.5; 95%CI (0.12 – 2.13); p=0.35). El análisis en cavidad es limitado dado el bajo número de eventos (5 pacientes HPV-PCR positivos en cavidad oral). Además, dado el limitado número de pacientes HPV-PCR positivos/IHC-p16 positivos (únicamente 4 pacientes) no se han podido analizar posibles diferencias en SG respecto a los pacientes HPV-PCR positivos/IHC-p16 negativos. De igual modo, tampoco hemos podido analizar diferencias entre subtipos de HPV, ya que la gran mayoría de los pacientes eran subtipo HPV-16 (figuras 9 y 10).



**Figura 19. Diferencias en SG y SLP de acuerdo al estatus de HPV**

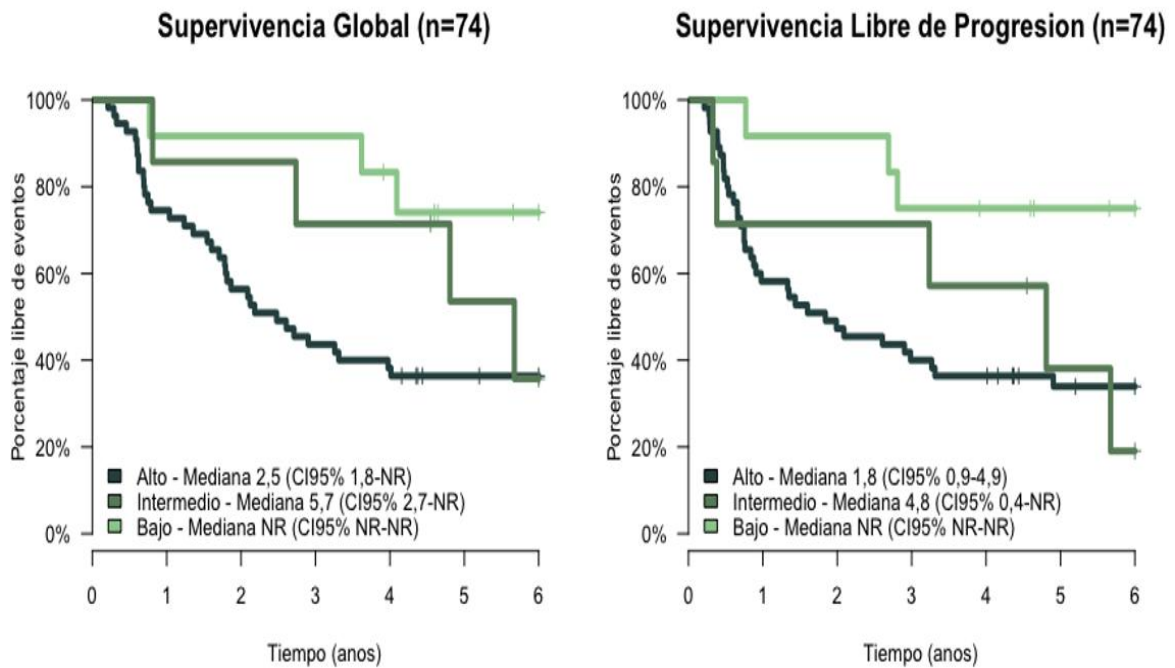


**Figura 10. Diferencias en SG y SLP combinando estatus de HPV (PCR) y localización tumoral**

### 6.3.4 Resultados de eficacia en función de subgrupos clínicos de riesgo

En nuestro estudio, la distribución de los pacientes en los grupos de riesgo descritos por *Ang KK et al.*(124) resultó pronóstica para SG y SLP. Así, 12 pacientes cumplían criterios clínicos de bajo riesgo de recurrencia (HPV-PCR positivos y fumadores  $\leq 10$  paquetes/año o HPV positivos y  $>10$  paquetes/año con N0-N2a), 7 pacientes correspondían al subgrupo de riesgo intermedio (HPV positivo,  $>10$  paquetes/año y N2b–N3 o HPV negativo, fumadores  $\leq 10$  paquetes/año y T2–T3) y 55 pacientes en el subgrupo de alto riesgo de recaída (HPV negativo,  $\leq 10$  paquetes/año y T4 o HPV negativo y  $>10$  paquetes/año]. Esta proporción variaba significativamente en función de la localización tumoral. Así, en tumores de orofaringe, un total de 9 (25.7%), 4 (11.4%) y 22(62.9%) pacientes correspondieron a los grupos de bajo, intermedio y elevado riesgo de recidiva, mientras en los tumores de cavidad oral un total de 3(7.7%), 3(7.7%) y 33 (84.6%) pacientes correspondieron a los grupos de bajo, intermedio y elevado riesgo de recidiva. En nuestro estudio, se observaron diferencias significativas en SLP cuando se comparaba el riesgo entre los grupos de alto y bajo riesgo (HR=3.7 CI95% 1.13-11.96, p=0.03 logrank test) sin observar diferencias significativas entre grupo intermedio y bajo (HR=2.9 CI95% 0.65-12.96, p=0.17 logrank test). De forma relevante, las diferencias observadas en SLP se reflejaban en beneficio en SG cuando se comparaba el riesgo entre los grupos de alto y bajo riesgo (HR=3.6 CI95% 1.11-11.86,

p=0.03 logrank test) sin observar diferencias significativas entre grupo intermedio y bajo (HR=1.8 CI95% 0.36-8.99, p=0.46 logrank test) (Figura 11).



**Figuras 11. Diferencias en SG y SLP entre grupos de riesgo bajo, intermedio y alto.**

### 6.3.5 Resultados de expresión génica

#### 6.3.5.1 Expresión génica mediante la plataforma PAM50 aplicada a la población global

En un total de 68 pacientes se pudo realizar el análisis de RNA en la biopsia pretratamiento, de los que 38 (56%) eran tumores de cavidad oral y 30 (44%) pacientes con tumores de orofaringe. Entre estos, la proporción de pacientes HPV positivos (PCR) fue de 10.2% (4/39) para tumores de cavidad oral y 26.6% (8/30) para tumores de orofaringe. De forma relevante, en un total de 4 pacientes HPV positivos por PCR (1 de cavidad oral y 3 de orofaringe) no se pudo realizar los análisis de expresión génica por falta de material o material de baja calidad.

### **6.3.5.2 Correlación de los perfiles de expresión génica identificados mediante la plataforma PAM50 con Supervivencia global y Supervivencia libre de progresión en la población global.**

En nuestra cohorte de 68 pacientes, la expresión de 4 genes de la plataforma PAM50 (FOXA1, MYC, BCL2, CEP55) y la firma génica Basal demostraron impacto en SG (Tabla 12), mientras que la expresión de 3 genes (FOXA1, CEP55 y TMEM45B) y nuevamente la firma Basal impactaron en SLP (Tabla 13). Respecto a la firma génica basal, engloba los siguientes genes sobreexpresados FOXC1, MIA, KNTC2, CEP55, ANLN, MELK; y los siguientes genes infraexpresados GPR160, TMEM45B, ESR1, FOXA1. En nuestro estudio un total de 11 (16%, 11/68) tumores presentaron expresión de la firma basal, un total de 22 (32.4%) tumores presentaron expresión de la Luminal A, 16 (23.5%) tumores expresaron HER2 enriched, 10 (14.7%) Luminal B y 9 (13.2%) normal-like. Cuando se representaba la proporción de los diferentes subtipos moleculares distribuidos en función de la localización tumoral, se objetivó como entre los tumores de cavidad oral, los subtipos Luminal A y HER2 enriched fueron los subtipos más frecuentemente expresados (26.3% ambos), Luminal B y Basal se expresaron con una frecuencia similar del 13.2% y normal-like un 21.1%. En los tumores de orofaringe, nuevamente el subtipo Luminal A fue el más frecuentemente expresado (40%), seguido de los subtipos HER2 enriched (20%), Basal (20%), Luminal B (16.7%) y normal-like un 3-3% (figura 12).

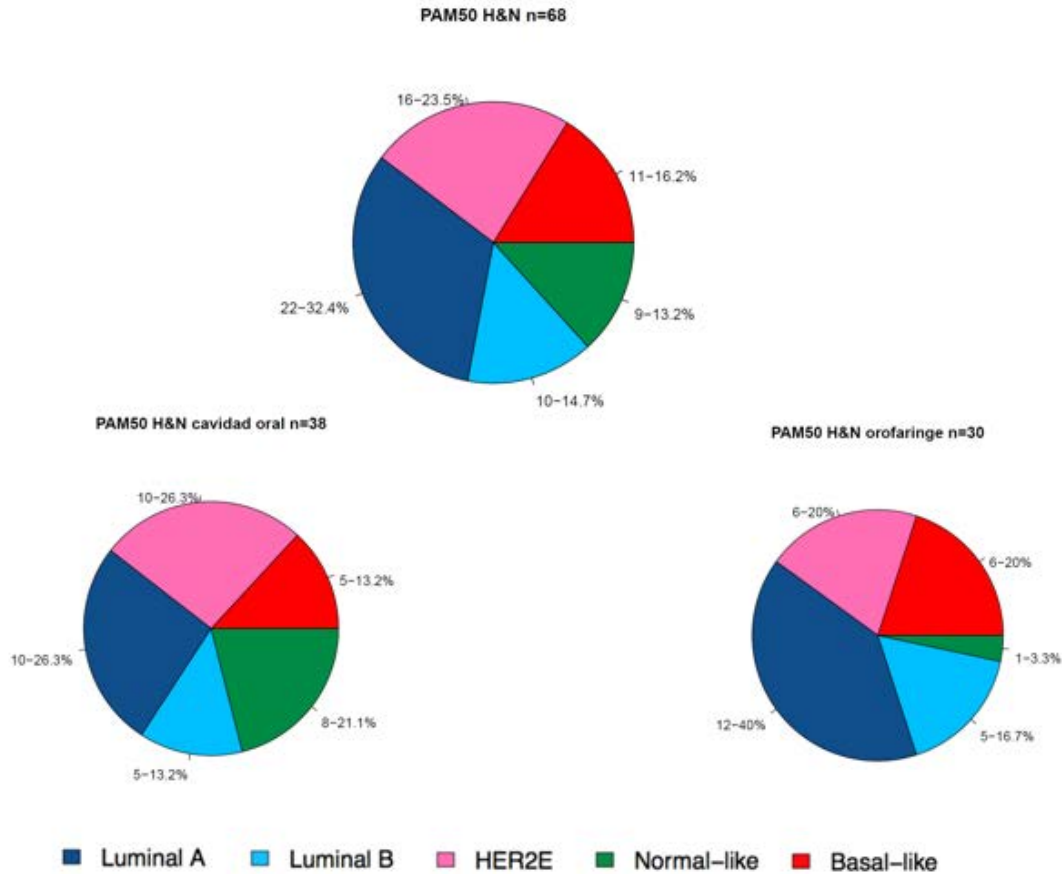


**Tabla 12: Expresión de los genes PAM50 e impacto negativo en SG**

Gen	Expresión	P value	Gen	Expresión	P value
<b>Basal</b>	<b>Sobreexpresión</b>	<b>0.04</b>	MAPT	NA	0.66
<b>FOXA1</b>	<b>Infraexpresión</b>	<b>0.02</b>	MDM2	NA	0.25
<b>CEP55</b>	<b>Sobreexpresión</b>	<b>0.04</b>	MELK	NA	0.56
<b>BCL2</b>	<b>Infraexpresión</b>	<b>0.05</b>	MIA	NA	0.40
<b>MYC</b>	<b>Sobreexpresión</b>	<b>0.03</b>	MKI67	NA	0.35
TYMS	NA	0.79	MLPH	NA	0.40
TMEM45B	NA	0.37	MMP11	NA	0.93
SLC39A6	NA	0.6	MYBL2	NA	0.47
UBE2C	NA	0.86	FGFR4	NA	0.68
SFRP1	NA	0.57	AR	NA	0.44
UBE2T	NA	0.94	ANLN	NA	0.75
RRM2	NA	0.46	ACTR3B	NA	0.72
RORP_MC	NA	0.24	EXO1	NA	0.31
RORS_MC	NA	0.43	ESR1	NA	0.75
PTTG1	NA	0.88	ERBB2	NA	0.21
PROLIF_MC	NA	0.21	EGFR	NA	0.23
PHGDH	NA	0.61	CXXC5	NA	0.65
PGR	NA	0.24	CENPF	NA	0.29
PDCD1	NA	0.86	CDH3	NA	0.76
NAT1	NA	0.10	CDCA1	NA	0.41
NORMAL_MC	NA	0.58	CDC6	NA	0.51
ORC6L	NA	0.74	CDC20	NA	0.41
FOXC1	NA	0.62	CD8A	NA	0.84
GPR160	NA	0.13	CD4	NA	0.84
GRB7	NA	0.10	CD274	NA	0.98
HER2_MC	NA	0.75	BAG1	NA	0.71
KIF2C	NA	0.60	BCL2	NA	0.05
KNTC2	NA	0.06	BIRC5	NA	0.86
KRT14	NA	0.79	BLVRA	NA	0.76
KRT17	NA	0.90	CCNB1	NA	0.14
KRT5	NA	0.17	CCNE1	NA	0.95
LumA_MC	NA	0.26			
LumB_MC	NA	0.87			

**Tabla 13: Expresión de los genes PAM50 e impacto negativo en SLP**

Gen	Expresión	p value	Gen	Expresión	p value
<b>Basal</b>	<b>Sobreexpresión</b>	<b>0.02</b>	MAPT	NA	0.90
<b>FOXA1</b>	<b>Infraexpresión</b>	<b>0.04</b>	MDM2	NA	0.82
<b>TMEM45B</b>	<b>Infraexpresión</b>	<b>0.02</b>	MELK	NA	0.22
<b>CEP55</b>	<b>Sobreexpresión</b>	<b>&lt;0.01</b>	MIA	NA	0.57
TYMS	NA	0.35	MKI67	NA	0.09
MYC	NA	0.10	MLPH	NA	0.23
SLC39A6	NA	0.63	MMP11	NA	0.74
UBE2C	NA	0.60	MYBL2	NA	0.78
SFRP1	NA	0.66	FGFR4	NA	0.64
UBE2T	NA	0.62	AR	NA	0.32
RRM2	NA	0.34	ANLN	NA	0.44
RORP_MC	NA	0.46	ACTR3B	NA	0.69
RORS_MC	NA	0.45	EXO1	NA	0.59
PTTG1	NA	0.49	ESR1	NA	0.82
PROLIF_MC	NA	0.24	ERBB2	NA	0.28
PHGDH	NA	0.49	EGFR	NA	0.12
PGR	NA	0.61	CXXC5	NA	0.92
PDCD1	NA	0.85	CENPF	NA	0.18
NAT1	NA	0.20	CDH3	NA	0.48
NORMAL_MC	NA	0.64	CDCA1	NA	0.27
ORC6L	NA	0.20	CDC6	NA	0.79
FOXC1	NA	0.93	CDC20	NA	0.58
GPR160	NA	0.38	CD8A	NA	0.85
GRB7	NA	0.14	CD4	NA	0.74
HER2_MC	NA	0.58	CD274	NA	0.94
KIF2C	NA	0.13	BAG1	NA	0.48
KNTC2	NA	0.12	BCL2	NA	0.26
KRT14	NA	0.9	BIRC5	NA	0.33
KRT17	NA	0.91	BLVRA	NA	0.90
KRT5	NA	0.61	CCNB1	NA	0.13
LumA_MC	NA	0.26	CCNE1	NA	0.44
LumB_MC	NA	0.68			



**Figura 12. Distribución de los subtipos moleculares descritos por PAM50 en función de la localización tumoral.**

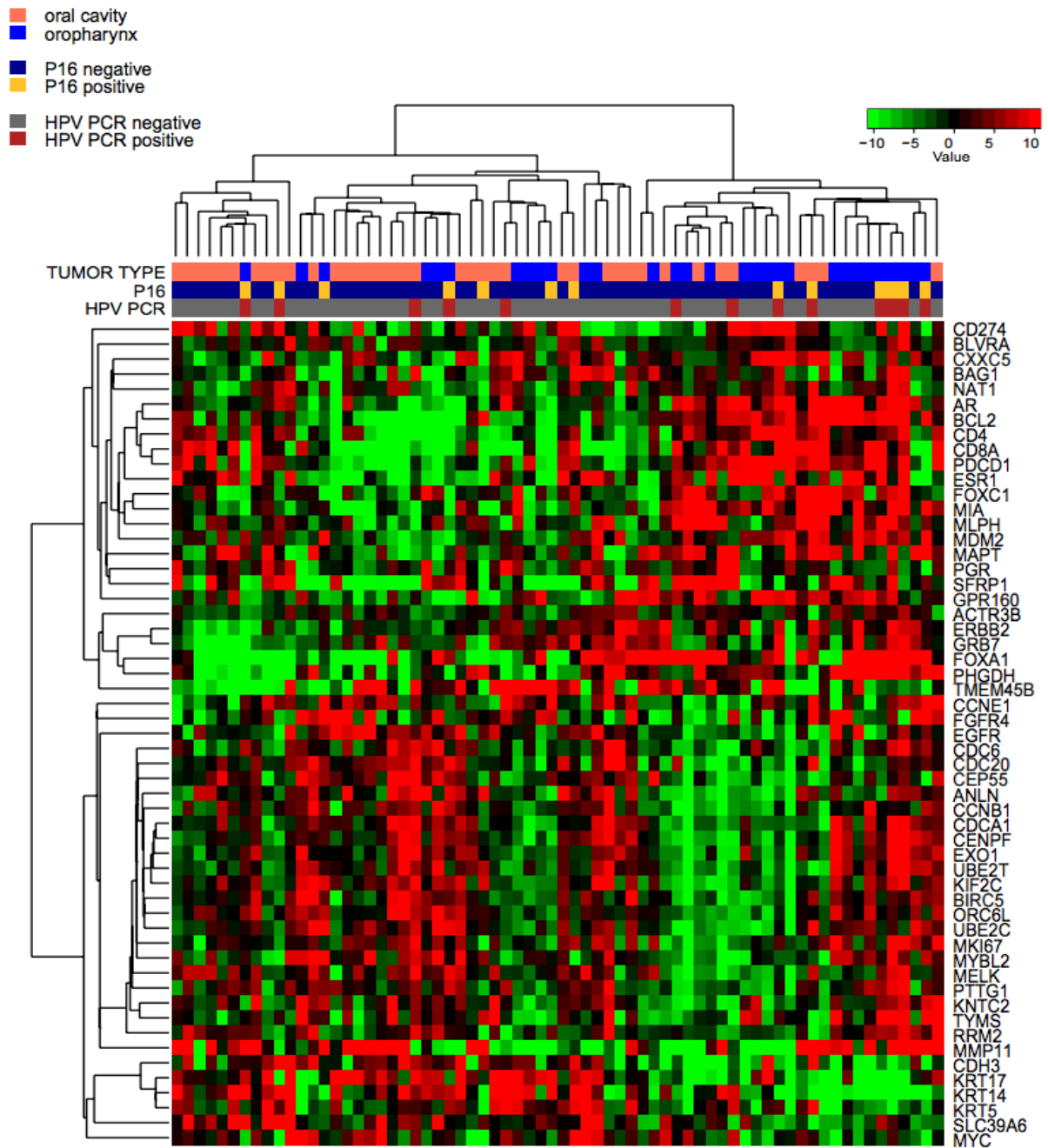
### **6.3.5.3 Correlación de los perfiles de expresión génica identificados mediante la plataforma PAM50, ajustados en función del estatus HPV o la localización tumoral**

En nuestro estudio analizamos las diferencias y similitudes de expresión entre los tumores de cavidad oral y orofaringe, así como entre los tumores HPV positivos y negativos. En nuestra cohorte de pacientes, la expresión de genes PAM50 no demostró diferencias significativas entre los tumores HPV positivos y negativos, independientemente del test realizado (PCR o IHC-p16), sin embargo hasta un total de 8 genes (13.3%; 8/60) mostraron un patrón diferenciado en función de la localización tumoral (orofaringe vs cavidad oral) con un False Discovery Rate (FDR) del 5%, sin diferenciación en los genes relacionados con inmunomodulación. Entre ellos, genes relacionados con diferenciación ectodérmica como KRT14, KRT5, KRT17, genes de la

familia de metaloproteasas como MMP11, genes relacionados con el control del ciclo celular como CDC20, genes de la familia de caderinas CDH3, y genes relacionados con el crecimiento y migración celular como ANLN se mostraron infraexpresados en tumores de orofaringe comparado con los tumores de cavidad oral, mientras que el gen de la familia de factores de transcripción FOXA1 se demostró sobreexpresado en tumores de orofaringe comparado con los tumores de cavidad oral (tabla 14, figura 13).

**Tabla 14: Expresión de los genes PAM50 significativamente diferenciados en tumores de orofaringe comparado con tumores de cavidad oral**

<b>Gen</b>	<b>Expresión</b>	<b>Score</b>
FOXA1	Sobreexpresado	3.07
KRT14	Infraexpresado	-2.29
MMP11	Infraexpresado	-2.11
CDH3	Infraexpresado	-1.60
KRT5	Infraexpresado	-1.51
KRT17	Infraexpresado	-1.39
CDC20	Infraexpresado	-1.35
ANLN	Infraexpresado	-1.35



**Figura 13.** Heatmap que muestra la expresión de genes del PAM50 y estratificación de los tumores en función de la localización tumoral (cavidad oral vs orofaríngea) y estatus de HPV. Muestras (N=69) distribuidas en columnas.

#### **6.3.5.4 Validación de los resultados de expresión génica mediante PAM50 en la base de datos del TCGA de tumores de cabeza y cuello**

En nuestro estudio, la expresión de los genes del PAM50 asociados con SG y SLP no se correlacionaba con los resultados de expresión y SG demostrados en los resultados del TCGA. Asimismo, al diferenciar los datos de expresión genómica del TCGA en función de la localización tumoral, seleccionando solo aquellos genes relacionados con tumores de cavidad oral y orofaringe, no encontramos correlación con nuestra firma de 8 genes diferenciados en cavidad oral y orofaringe.

## 7. Discusión

En nuestro trabajo de tesis realizado sobre una serie de 83 pacientes con tumores de cavidad oral y orofaringe localmente avanzados e irresecables, tratados con intención curativa mediante la combinación de quimioradioterapia, terapias anti-EGFR y radioterapia o quimioterapia de inducción, hemos confirmado la hipótesis principal del estudio, demostrando el impacto pronóstico de la positividad de HPV en términos de beneficio en SLP y SG para la población global del estudio.

En nuestro estudio hemos determinado la positividad para HPV mediante dos métodos, PCR y el estudio de expresión de inmunohistoquímica de p16. Estos estudios, realizados de forma retrospectiva en la biopsia tumoral pretratamiento han demostrado una positividad para la población global del 19.2% de los pacientes determinada por PCR y del 18% para la IHC-p16. La distribución de estos resultados en función de la localización tumoral, ha demostrado como entre los pacientes con tumores de orofaringe la positividad para HPV era del 28% y del 27% mediante PCR e IHC-p16 respectivamente, mientras que para tumores de cavidad oral la positividad fue del 12% por PCR y del 9% por IHC. Por tanto, nuestro estudio ha demostrado que la implicación del HPV como agente etiológico en los tumores de cabeza y cuello está influenciada por la localización tumoral. En nuestro estudio, la prevalencia reportada para ambas localizaciones es similar a la reportada en diferentes series (30–72 % en orofaringe, y 1–19% en otras localizaciones, incluida cavidad oral) (7, 124, 206, 306). Nuestro estudio también confirmó los hallazgos sugeridos por otros estudios en los que de forma relativamente frecuente se observan casos de pacientes que no expresan IHC-p16 pero el estudio de DNA viral resulta positivo y viceversa, casos en los que expresando IHC-p16 no se observa positividad para estudio de PCR. Sobre el total de pacientes en los que se pudo realizar las dos determinaciones (80/83, 96.38%), un 5% de los pacientes fueron IHC-p16 negativos/HPV-PCR positivos y otro 5% fueron IHC-p16 positivos/HPV-PCR negativos, siendo esta tasa es similar a la reportada en la literatura. Diferentes argumentos han intentado explicar el origen y significado de este subgrupo de tumores IHC-p16 positivos/HPV-PCR negativos, entre los que se ha sugerido que podría tratarse de un grupo mixto de pacientes que incluiría tumores verdaderamente

positivos en los que estudio HPV se consideraría como falso negativo, y una proporción de tumores que deberían considerarse como verdaderamente HPV negativos y en los que probablemente otros mecanismos moleculares han llevado a la sobreexpresión de IHC-p16 en ausencia de infección por HPV. Por tanto, el valor pronóstico de IHC-p16 en estos casos puede estar marcado por HPV pero también por otras alteraciones moleculares como pérdida de RB1, que también podría producir la sobreexpresión de p16. Los datos más relevantes al respecto, fueron los publicados por el grupo del TCGA, donde hasta el 4% de los tumores HPV negativos presentaban mutaciones de RB1 (221, 307, 308). Respecto al 5% de pacientes IHC-p16 negativos/HPV positivos se ha sugerido que este subgrupo correspondería en parte a resultados falsos negativos para IHC-p16, ya que según los datos del TCGA, ninguno de los tumores HPV positivos presentaban inactivación del gen que codifica para p16 (*CDKN2A*). Por tanto es necesario aportar mas evidencia científica para completar el valor de estos hallazgos (221). Globalmente la concordancia entre IHC-p16 y HPV-PCR demostrada en nuestro estudio fue óptima, aunque variable en función de la localización primaria, siendo menos significativa en los tumores de cavidad oral, en los que a pesar de que IHC-p16 demostró una sensibilidad del 94%, la especificidad de la prueba era limitada, siendo del 40%. Estos hallazgos, reflejan la heterogeneidad y diferencias biológicas de ambas localizaciones tumorales, así como la limitada sensibilidad de la técnica IHC-p16 para detectar la presencia de HPV en localizaciones diferentes a la orofaringe. Resultados contradictorios se han reportado hasta la fecha en lo referente a la sensibilidad y especificidad de los test diagnósticos de HPV en localizaciones diferentes de orofaringe, llegado algunos estudios han sugerido una sensibilidad de IHC-p16 incluso más limitada que la reportada en nuestro estudio, 40% para IHC-p16 comparado con 95% para técnicas de detección de DNA (306). Por tanto la valoración de los resultados de IHC-p16 debe ser interpretada en el contexto de la localización tumoral primaria, el área geográfica y la probabilidad positiva pretest. Así, en tumores de orofaringe en Estados Unidos, donde dada la elevada incidencia de HPV positivo, la probabilidad pretest puede alcanzar el 70%, la IHC-p16 presentará un elevado valor predictivo positivo y negativo, (superiores al 90%), sin embargo en tumores de cavidad oral, con una probabilidad pretest limitada, la IHC-p16 tendrá una escasa especificidad y un valor predictivo positivo alrededor del 40%. Por tanto, el uso de IHC-p16 como marcador surrogado de infección por HPV en tumores de localización diferente a orofaringe, está ampliamente desaconsejado (205, 306, 309).



A pesar de las limitaciones de IHC-p16 como marcador surrogado de infección por HPV en cavidad oral, nuestro estudio ha demostrado como la positividad para IHC-p16 impacta de forma pronóstica de forma similar a HPV-PCR en la población global del estudio. Así, en el análisis multivariado la positividad de HPV, tanto HPV-PCR como de IHC-16, impactaron en SLP (HP-PCR positivo HR 0.18,  $p=0.01$ ; IHC-p16 HR = 0.09,  $p < 0.01$ ) como en SG (HPV-PCR positivo HR =0.24 ,  $p=0.03$ ; IHC-p16 HR = 0,14  $p=0.01$ ). Sin embargo, al analizar el impacto de HPV-PCR o IHC-p16 en función de la localización tumoral, demostramos como éste impacto estaba influenciado por la localización tumoral. Así, la positividad de HPV resultó pronóstica independiente para SLP (HR 0.12 (95% CI 0.02 –0.66,  $p=0.01$ )) y SG (HR 0.18 (95% CI 0.04–0.85,  $p=0.03$ )) en tumores de orofaringe, sin embargo para los tumores de cavidad oral, el impacto pronóstico sólo se pudo realizar en análisis univariable, dado el limitado número de pacientes HPV positivos en cavidad oral. En el análisis univariado, no pudimos determinar el que el impacto positivo del HPV fuera diferente al de orofaringe, pero las limitación a la hora de llevar a cabo un análisis multivariado, implica que en nuestro estudio no podemos concluir que HPV sea un factor pronóstico independiente en cavidad oral.

Diferentes estudios han reportado resultados concordantes con nuestros hallazgos respecto al mayor impacto de la infección por HPV en tumores de orofaringe (124, 261, 272, 310-312), sin embargo los resultados difieren en otras localizaciones. Así, en tumores de lengua oral, algunos estudios no han demostrado correlación pronóstica con el estatus de IHC-p16 (313), mientras que en otros estudios, como el publicado por Harris et al, sí se objetivó dicho impacto. Recientemente, un metaanálisis de 34 estudios, incluyendo todas las localizaciones tumorales primarias, demostró el beneficio en SG para los pacientes HPV positivos comparado con los pacientes HPV negativos (HR = 0.4, 95 % CI 0.2–0.6,  $p = 0.0001$ ) en todas las localizaciones, siendo los tumores de orofaringe en los que mayor impacto se objetivó (314). Recientemente otro estudio publicado por *Chung et al* (202) analizó el impacto pronóstico de IHC-p16 y HPV-ISH en tumores de cabeza y cuello no-orofaríngeos, al analizar de forma conjunta los datos de tres estudios del grupo Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) (RTOG 0129, 0234, y 0522). Combinando ambos estudios, se observó elevada positividad para IHC-p16, del 26.3% para tumores de cavidad oral,

16.4% hipofaringe y 17.1% para tumores de laringe, mientras que la positividad por HPV-ISH fue del 14.6%, 5.3%, y 7.9% respectivamente. De forma relevante, IHC-p16 impactó significativamente en SLP y SG con HR de 0.65 y 0.57, y sin embargo la positividad por HPV-ISH no impactó estadísticamente, probablemente por el limitado número de pacientes HPV-ISH positivos, y por la alta proporción de falsos negativos de los test de DNA virales, descritos hasta en el 13-41% de los casos (199, 212). Respecto a la interpretación de los resultados de HPV, es importante recordar que hasta el 7% de la población sana adulta puede presentar colonización por HPV y hasta el 1% puede presentar positividad para un subtipo de alto riesgo de HPV (167), por lo que estos datos podrían explicar parte de la proporción de resultados falsos positivos. Por tanto, y dado los resultados del estudio de *Chung et al*, se puede sugerir la utilidad de la IHC-p16 como segundo marcador identificativo de HPV, principalmente cuando el estudio de HPV se realice mediante test de estudio de DNA viral, ya que ninguno de ellos por sí mismos disponen de la suficiente eficacia diagnóstica.

Poniendo nuestros resultados de impacto pronóstico de HPV en el contexto de lo reportado en la literatura, el estudio que más información pronóstica ha aportado al respecto en tumores de orofaringe, es el estudio RTOG019 (124), en el cual la SG a los 3 años fue del 64% en el grupo de radioterapia acelerada y del 70% para el tratamiento estándar con radioterapia y quimioterapia. El beneficio observado con los tratamientos de radioterapia y quimioterapia en los pacientes con tumores HPV positivos se ha intentado explicar desde el punto de vista biológico. Diferentes estudios han asociado este beneficio a una mayor radiosensibilidad en las células tumorales HPV positivas, debido a la presencia de deficiencias en los mecanismos de recombinación homóloga asociados con la reparación de DNA que ocurren tras el tratamiento de radioterapia y quimioterapia. Esta inhibición en la respuesta al daño de DNA es mediada por p16 y se ha considerado independiente de su función como reguladora del ciclo celular, la que estaría mediada por la inhibición de la actividad de CDK4/6 (278). Además, tanto la presencia de p53 normofuncionante que caracteriza a los tumores HPV positivos, como la menor exposición tabáquica/alcohol habitual en estos pacientes, también se han asociado con una mayor sensibilidad a la radioquimioterapia(315). Por último, también se ha sugerido un aumento de la sensibilidad a la apoptosis celular en los queratinocitos infectados por HPV cuando se exponen a quimioterapia basada en cisplatino (316). En nuestro estudio, el impacto pronóstico de IHC-p16 en la población global del estudio,

incluida cavidad oral, requeriría de confirmación en estudios más amplios y que valoren dicho impacto de una forma prospectiva.

En nuestro estudio, también analizamos el impacto pronóstico de otros factores clínicos y tumorales clásicamente relacionados con pronóstico, y observamos como estadios IV, estadios T3-T4 y el tratamiento con cetuximab-radioterapia impactaban en el pronóstico de la población global. En nuestro estudio, el hábito tabáquico no impactó significativamente en SLP y SG. El impacto pronóstico del tabaco en la población HPV positiva es controvertido. Diversos estudios han sugerido la asociación pronóstica del tabaco, de forma independiente del estatus de HPV (239). Se ha demostrado como los pacientes fumadores con tumores de orofaringe HPV positivos presentan mayor riesgo de recurrencia, afectación metastásica a distancia y peor SG que aquellos pacientes HPV positivos no fumadores (295, 317-319). A la hora justificar estos resultados se ha sugerido un efecto sinérgico entre HPV y tabaco que podría asociarse con un mayor daño de DNA durante la integración del genoma viral, que el de por sí ya asociado a la exposición, conllevando todo ello un aumento del potencial carcinogénico de la infección por HPV (320). Dado la limitación de casos HPV positivos en nuestro estudio, no pudimos llevar a cabo análisis de correlación e impacto del hábito tabáquico en el subgrupo de pacientes HPV positivos. De forma relevante en nuestro estudio hemos sido capaces de confirmar y validar la distribución de los pacientes en los grupos pronóstico descritos por *Ang et al.* (124). A pesar de lo limitados de los números, combinando los factores pronósticos clásicos como estatus de HPV, hábito tabáquico y estadio tumor primario y ganglionar, hemos sido capaces de demostrar diferencias estadísticamente significativas en SLP entre los pacientes de riesgo alto y bajo (HR=3.7 CI95% 1.13-11.96, p=0.03 logrank test), reflejándose estas diferencias en beneficio en SG (HR=3.6 CI95% 1.11-11.86, p=0.03 logrank test). De forma interesante en nuestro estudio describimos una mayor proporción de pacientes en el grupo de elevado riesgo de recidiva entre los tumores de cavidad oral comparado con los tumores de orofaringe (84.6% vs 62.9%). Por tanto, los pacientes con importante factor de exposición al tabaco o alcohol deberán ser monitorizados estrechamente dado el elevado riesgo de recurrencia, independientemente del estatus de HPV, así como los médicos tenemos que activamente fomentar el abandono de dichos hábitos.

En nuestro estudio, los pacientes con tumores HPV positivos, tanto por PCR como por IHC-p16, presentaron mejor resultados de eficacia, valorada por las tres variables: tasa de respuestas completas a la finalización del tratamiento, SLP a los 3 años y SG a los 5 años. Los datos de 81% de SLP a los 3 años y SG a los 5 años del 58%, sin diferencias estadísticamente significativas en función de la localización tumoral, reflejan y confirman el excelente pronóstico global de los pacientes HPV positivos. A pesar de que en nuestro estudio, combinado los resultados de IHC-p16 y HPV-PCR tenía el potencial de caracterizar la presencia de una infección activa por HPV (tumores HPV positivos/IHC-p16 positivos)(211) y valorar diferencias entre los subgrupos HPV-PCR positivos/IHC-p16 positivos y HPV-PCR positivos/IHC-p16 negativos, el limitado número de pacientes HPV-PCR positivos/IHC-p16 positivos (únicamente 4 pacientes) ha impedido llevar a cabo este análisis. De igual modo, tampoco hemos podido analizar las diferencias entre subtipos de HPV, ya que la gran mayoría de los pacientes eran subtipo HPV-16.

De forma relevante, nuestro estudio ha sugerido diferencias pronósticas en función de los tratamientos realizados. Así, los análisis multivariados han sugerido un impacto pronóstico negativo en los pacientes tratados de forma concomitante con anti-EGFR(cetuximab) y radioterapia, observando estos hallazgos en ambas localizaciones tumorales estudiadas, sin embargo, dado el limitado número de pacientes, no hemos podido analizar el impacto predictivo del HPV en la eficacia los tratamientos realizados. A pesar de estos resultados es importante mencionar que respecto a la utilización de cetuximab-radioterapia hay un sesgo de selección importante, ya que la mayoría de los pacientes seleccionados como candidatos para este abordaje terapéutico, son pacientes con un estado general más limitado, que no son tributarios de realizar tratamientos radicales con altas dosis de cisplatino. La mayoría de los estudios reportados hasta la fecha han sugerido como el beneficio de los pacientes HPV positivos es independiente de los tratamientos realizados. Los datos más relevantes respecto al impacto del tratamiento concomitante anti-EGFR (cetuximab) y radioterapia han sido reportados recientemente, a partir de un subanálisis del estudio pivotal de concomitancia de *Bonner et al* (111). En este estudio, que valoraba la eficacia de radioterapia y cetuximab en el tratamiento de los tumores localmente avanzados de cabeza y cuello, la SG a los 3 años fue del 55% vs el 45% favoreciendo la adición de cetuximab a la radioterapia, siendo el mayor beneficio observado en pacientes con características clínicas que sugerían la

presencia de HPV, como tumores T1-T3, de localización en orofaringe y con importante afectación ganglionar. En la actualidad los resultados de la mayoría de los estudios fase II/III que comparan la eficacia de la combinación de terapia anti-EGFR y radioterapia con el tratamiento estándar de quimioradioterapia no han sido reportados. Los primeros resultados de esta comparación de estrategias fueron reportados por el estudio fase II GORTEC/TREMLIN. Este estudio, que comparaba las dos estrategias terapéuticas tras la realización de quimioterapia de inducción en tumores de laringe, no demostró diferencias en SLP o SG (132). El estudio CONCERT-2, fue el primer estudio randomizado que comparó directamente ambas estrategias de tratamiento concomitante en pacientes con tumores de cabeza y cuello localmente avanzados. En este estudio, en el que el tratamiento biológico utilizado fue el anticuerpo monoclonal panitumumab, el tratamiento estándar demostró un mejor control locoregional a los 2 años ( $p = 0.06$ ) y mejor SLP ( $p = 0.03$ ) sin diferencias en SG a los 2 años. Además, el subanálisis de los resultados en función del estatus de HPV demostró como el beneficio del tratamiento estándar era independiente del estatus de HPV (135). Otro estudio complementario, usando en este caso cetuximab también sugirió un beneficio no estadísticamente significativo para el tratamiento estándar en control locoregional (80% vs. 53%,  $p = 0.073$ ), sin diferencias en SG (78% vs. 75%) (133). Aportando más evidencia, el estudio canadiense HN.6 en el que se comparaba en tratamiento estándar de quimioradioterapia y el tratamiento de radioterapia acelerada con panitumumab no demostró diferencias en SLP entre ambos tratamientos, sin embargo el estudio no fue diseñado como un estudio de no inferioridad, por lo que el tratamiento biológico no se puede considerar equivalente al tratamiento estándar (137). Recientemente, algunos estudios retrospectivos, han reportado los resultados de la experiencia en centro individuales en el tratamiento de los pacientes con tumores localmente avanzados tratados con las dos estrategias de concomitancia, en los que ha realizado retrospectivamente la implicación del estatus de HPV. Estos estudios, no han sugerido diferencias significativas para ambas estrategias en los pacientes HPV positivos, quedando pendiente la confirmación prospectiva (321).

Al igual que ocurre con el impacto del HPV en la terapia anti-EGFR y radioterapia, nuestro estudio no ha podido caracterizar el impacto predictivo del estatus de HPV en los resultados de la quimioterapia de inducción, nuevamente debido a lo limitado de los números. Sin embargo la quimioterapia de inducción no impactaba

negativamente en los resultados pronósticos de SLP y SG, al contrario que lo sugerido respecto al tratamiento con cetuximab y radioterapia. Los diferentes estudios randomizados que han comparado el tratamiento concomitante con quimioradioterapia y la quimioterapia de inducción, han demostrado como la quimioterapia de inducción se asociada a una elevada tasa de respuestas y una disminución en el riesgo de presentar enfermedad metastásica. Sin embargo, ese beneficio no se traduce en una mejoría en SG y por lo tanto existe gran debate en la comunidad científica respecto a las indicaciones y el uso óptimo de la terapia secuencial(142, 143, 145, 146). Pocos estudios han analizado el impacto del estatus de HPV y el beneficio de la quimioterapia secuencial. Así, el estudio TAX-324 ha reportado una SG a los 3 años en pacientes con tumores de orofaringe del 58%, siendo la SG de los tumores HPV positivos del 91% y del 46% para los tumores HPV negativos. Es importante remarcar que en este estudio no se realizaba una comparación directa de los resultados con el tratamiento estándar de quimioradioterapia (266). Otro estudio danés, describió como la SG a los 3 años para los pacientes IHC-p16 positivos era del 62% comparado con el 26% de los IHC-p16 negativos (y HPV-negativos) (267).

Dado el buen pronóstico de los pacientes con tumores HPV positivos reportado por nuestro y muchos otros estudios, se están desarrollando diferentes estrategias terapéuticas con la finalidad de disminuir la toxicidad a largo plazo asociada a los tratamientos con intención radical, manteniendo los beneficios de control oncológico. Estas estrategias terapéuticas, se basan principalmente en analizar el impacto de la desintensificación de tratamiento, ya sea aplicando nuevas técnicas de radioterapia o sustituyendo la quimioterapia basada en platino terapias biológicas que podrían estar asociadas a menor toxicidad. Sin embargo estas estrategias de manejo diferenciado de los pacientes con tumores HPV positivos no se han implementado en la práctica rutinaria de forma extensa a la espera de la confirmación obtenida a través de estudios clínicos prospectivos. La desintensificación de tratamiento con radioterapia fue sugerida como posible estrategia terapéutica gracias a los resultados de varios estudios en los que se observaba como la radioterapia acelerada fraccionada (6 fracciones por semana) mejoraba en control locoregional comparado con el tratamiento convencional de RT (HR 0.73) principalmente en tumores HPV (p16) positivos (HR: 0.56 (0.33–0.96), aunque también el HPV (p16) negativos (HR: 0.77 (0.60–0.99)) (268). El manejo futuro de los pacientes con tumores HPV incluye desde el uso de tratamiento de quimioterapia

y radioterapia menos intensos, asociados a menor toxicidad, hasta mejoras en las técnicas quirúrgicas como sería el caso de la cirugía robótica transoral. Además, dado el beneficio observado con inmunoterapias en otras localizaciones tumorales, el desarrollo de este campo tanto en monoterapia como en combinación con tratamientos concomitantes de quimioradioterapia podría cambiar la historia natural y el tratamiento de estos tumores. Todos estos avances, deberían asociarse a un mejor conocimiento de las características biológicas que diferencian a los tumores HPV positivos y negativos, así como identificar el subgrupo de pacientes que dentro de los HPV positivos se asocian a mejor y peor pronóstico, lo que favorecería el desarrollo de estrategias terapéuticas específicas para cada subgrupo de pacientes. De forma paralela, el conocimiento de las características genómicas diferenciadas en cada subgrupo de pacientes permitiría el desarrollo de biomarcadores predictivos de beneficio a nuevas terapias, incluidas inmunoterapias (322, 323).

Con el objetivo de obtener un mejor conocimiento de los factores genómicos diferenciados en los tumores de cavidad oral y orofaringe, relacionarlos con el estatus de HPV y valorar su impacto pronóstico, en nuestro estudio hemos llevado a cabo estudios de perfiles de expresión génica mediante la plataforma PAM50, pudiendo incluir para el propósito de nuestro estudio el análisis de 5 genes adicionales (AR CD8A, PDCD1 o PD1 y CD274 (PDL-1), relacionados mayoritariamente con la inmunomodulación. Esta plataforma fue inicialmente desarrollada en cáncer de mama, siendo capaz de diferenciar 4 subtipos biológicos (luminal A, luminal B, Basal like y Her2-enriched) con diferencias en pronóstico, respuestas a terapias y patrones de diseminación(304). Recientemente, la plataforma PAM50 ha conseguido identificar como el subtipo tumoral “basal like”, característicamente asociado a cáncer de mama, también podía identificarse en otras localizaciones tumorales primarias, principalmente en tumores escamosos de pulmón, pero también en cáncer de ovario, glioblastomas, cáncer colorectal y adenocarcinomas de pulmón. Estos hallazgos sugieren que una misma estrategia terapéutica podría plantearse en tumores de diferentes localizaciones pero que comparten similitudes biológicas (305). Por ejemplo, se ha descrito que el 11% de los tumores de pulmón se identifican los subgrupos luminales A y B de cáncer de mama, lo que sugeriría que en los tumores de pulmón también están influenciados por la regulación hormonal(305). Hallazgos similares respecto a la identificación de subtipos basales y luminales en cáncer de vejiga y tumores de próstata han sido recientemente

publicados, confirmando la hipótesis de que las diferencias y similitudes biológicas pueden trascender el órgano de origen tumoral y pueden ser identificadas con plataformas de expresión génica como PAM50(324, 325).

Por tanto, el objetivo de nuestro estudio es valorar por primera vez la utilidad de la plataforma PAM50 a la hora de identificar grupos pronósticos asociados tumores de cavidad oral y orofaringe, así como valorar su asociación con el estatus de HPV. En nuestro estudio, diferentes genes impactaron de forma individual en SLP y SG, siendo relevante la asociación de la sobreexpresión de la firma basal con peor SLP ( $p=0.02$ ) y SG ( $p=0.04$ ). En nuestro estudio hasta en 16% de los tumores (20% en tumores de orofaringe y 13% en tumores de cavidad) presentaron patrón basal, sin ser estas diferencias significativamente estadísticas. El impacto pronóstico del subgrupo basal es similar al peor pronóstico reportado para el subtipo basal de cáncer de mama (326). La identificación de subgrupos basados en perfiles de expresión génica en tumores de cabeza y cuello inicialmente reportada en 2004 por *Chung et al* (259) describió 4 subtipos moleculares en análisis realizados sobre 60 tumores de cabeza y cuello de los que solo 15 (25%) eran tumores de cavidad oral y 14(23%) orofaringe. Este estudio identificó los subtipos moleculares basal, atípico, mensequimal y clásico, que posteriormente fueron confirmados en dos estudios independientes, de la Universidad del Carolina del Norte ( $n=138$ ) y del TCGA ( $n=297$ ) (185, 221). El estudio de la Universidad de Carolina del Norte<sup>239</sup> incluyó, sobre el total de 138 pacientes, un total de 55 tumores de cavidad oral y 34 tumores de orofaringe, entre los que el 55% de los tumores de cavidad oral y el 9% de los tumores de orofaringe se consideraban tumores con características basales. En este estudio, la expresión génica de los tumores basales se consideró similar a la de las células basales del epitelio de vía aérea, como la sobreexpresión de COL17A1, factores de crecimiento EGFR y TGGFA y el factor de transcripción TP63, sugiriendo por tanto la similitud con los perfiles de expresión en tumores escamosos de pulmón (327). Además, la identificación de estos subtipos moleculares tenía implicaciones pronósticas, siendo el subtipo basal el que se asoció a peor pronóstico y sugiriendo además que el subtipo basal podría presentar una significativa sensibilidad a quimioterapias basadas en platino, ya que la exposición a platino se asocia a disminución de DNp63 (328). En el estudio del TCGA (221), sobre una cohorte de 279 pacientes, de los que 172(62%) eran cavidad oral y 33 (12%) era tumores de orofaringe, también se identificaron los subgrupos moleculares previamente



descritos, representando el grupo basal el 31% de los tumores y asociándose a baja expresión de CDKN2A (p16<sup>INK4A</sup>). Por otra parte, el subgrupo mesenquimal (27%) se caracterizó por la expresión de genes asociados con la transición epitelio-mesenquimal, el subgrupo atípico (24%) estaba representado con una elevada frecuencia en tumores HPV positivos, con mutaciones de PIK3CA, y baja expresión de EGFR, y el subgrupo clásico (18%) se asociaba a elevada expresión de genes relacionados con el estrés oxidativo. De forma paralela, el grupo de la Universidad del Carolina del Norte, demostró como los subgrupos basales, mesenquimal y clásico de tumores de cabeza y cuello se correlacionaban de forma relevante con el subtipo basal y clásico de cáncer de mama y pulmón (248). Desafortunadamente, en nuestro estudio, los genes de PAM50 no se demostraron pronósticos de forma individual al realizar la validación de los resultados en la cohorte del TCGA, limitando por tanto la interpretación de los resultados.

De forma relevante los estudios de expresión génica realizados fueron capaces de identificar hasta un total de 8 genes diferenciados en tumores de orofaringe y cavidad oral, principalmente genes relacionados con diferenciación ectodérmica, genes de la familia de las metaloproteasas, genes relacionados con el control del ciclo celular, genes de la familia de caderinas y genes relacionados con el crecimiento, migración celular y factores de transcripción. Estos hallazgos ponen de relieve las diferencias biológicas de ambas localizaciones tumorales. Sin embargo, no identificamos genes asociados de forma estadísticamente significativa entre los tumores HPV positivos comparado con HPV negativos, siendo una de las posibles causas el número limitado de pacientes HPV positivos en los que se pudo realizar el estudio genómico (16% del total de pacientes con datos de expresión génica). También es importante remarcar que los análisis realizados por el grupo de la Universidad de Carolina del Norte y del TCGA se realizaron sobre paciente quirúrgicos, a diferencia de lo realizado en nuestro estudio, centrado en pacientes localmente avanzados e irsecables que completaron tratamiento radical con quimioradioterapia, terapia anti-EGFR y radioterapia o quimioterapia de inducción, y realizándose por tanto los estudios de expresión génica en la biopsia pretratamiento. Por tanto, los resultados de los estudios de la Universidad de Carolina del Norte y del TCGA aportan predominantemente información pronóstica, siendo necesario la realización de estudios que permitan analizar el impacto predictivo de los subtipos genómicos en los diferentes tratamientos realizados, tanto tratamientos

citotóxicos, como terapias alternativas biológicas, como las terapias anti-EGFR. En nuestro estudio la gran mayoría de los pacientes con datos de expresión génica realizaron tratamiento de quimiorradioterapia concomitante y únicamente 4 pacientes habían completado tratamiento con cetuximab-radioterapia, limitando por tanto los análisis de impacto predictivo al tratamiento. Otra de las limitaciones de los estudios de expresión génica son el análisis conjunto de diferentes localizaciones tumorales primarias, y por tanto incluyendo una importante heterogeneidad en los datos. Asimismo, el número limitado de pacientes HPV positivos incluidos en los estudios de expresión génica dificulta el establecimiento de patrones de expresión génica claramente diferenciados entre los tumores HPV positivos y los HPV negativos. Así, en el estudio de la Universidad del Carolina del Norte, sobre un total de 138 pacientes, la positividad global para HPV del 10% (14/138), mientras que en el estudio del TCGA sobre un total de 297 tumores de cabeza y cuello, únicamente 36 (12%) pacientes HPV positivos fueron incluidos. Por tanto, la proporción del 16% (11/68) de pacientes HPV positivos incluidos en nuestro estudio es remarcable. Recientemente, en un estudio que incluía una población de 130 pacientes con tumores localmente avanzados, de los que 25 (19%) eran de cavidad oral y 75 (58%) eran de orofaringe, todos tratados con preservación de órgano, se incluyó una elevada frecuencia de tumores HPV positivos (42%)(249). En este estudio, los análisis de expresión génica fueron capaces de caracterizar el grupo de tumores HPV positivos, sugiriendo que los grupos de expresión génica en tumores de cabeza y cuello quedarían definidos como: subtipo basal (elevada expresión de EGFR y genes relacionados con hipoxia, como HIF1A), mesenquimal, clásico, HPV positivo-mesenquimal y HPV positivo-clásico. De forma significativa, los tumores HPV positivos-mesenquimales presentan mayor sobreexpresión de genes involucrados en la respuesta inmune y el control del ciclo celular que los tumores HPV negativos-mesenquimales. De forma similar ocurre en los HPV positivos-clásicos. Paralelamente, se demostró la correlación pronóstica de esta clasificación, siendo los dos subgrupos HPV positivos los que presentaban un mejor pronóstico, principalmente el subgrupo HPV positivo-mesequimal (249). Por último, *De Cecco* et al. reportó los resultados de un metaanálisis en el que pudo describir una firma de 172 genes, combinando 9 bases de datos con información de expresión génica disponible. Esta firma génica se correlacionó con pronóstico de forma independiente al estatus de HPV, aunque la positividad de HPV en el estudio era del 11% (329).

Por tanto, los estudios de expresión génica realizados en tumores de cabeza y cuello han sido capaces de aportar de diferenciar subtipos moleculares diferenciados, con diferencias pronósticas e incluso, recientemente se han sugerido diferencias en el grupo de pacientes con tumores HPV positivos. Sin embargo la escasez de estudios realizados, así como de la inclusión conjunta de diferentes localizaciones tumorales, con escasa representación de tumores HPV positivos limita la interpretación de los resultados. Por otro lado, a pesar del valor pronóstico reportado, el valor predictivo y utilidad clínica a la hora de determinar la estrategia terapéutica individualizada son aún limitados. Esto último es de gran importancia, ya que debido al excelente pronóstico de los pacientes con tumores HPV positivos, se ha postulado que un grupo de estos pacientes se podrían beneficiar de completar tratamientos asociados a menor toxicidad a largo plazo. Por tanto, al igual que ocurre en otras patológicas, como en cáncer de mama, identificar a los pacientes que dentro del grupo de tumores HPV positivos, presentan un excelente pronóstico basado en perfiles de expresión génica, adquiere una importancia significativa.

Nuestro estudio tiene presenta diferentes limitaciones. Por un lado, aquellas limitaciones relacionadas con las características retrospectivas del estudio; por otro lado el número limitado de pacientes HPV positivos en cada una de las localizaciones tumorales que limita la interpretación de nuestros resultados. Sin embargo, a pesar estos factores, los datos de incidencia están ajustados a lo reportado en nuestro medio y hemos sido capaces de confirmar la principal hipótesis de nuestro estudio, como es la de demostrar el impacto positivo de la infección por HPV en este subgrupo de pacientes. Además, la heterogeneidad de la muestra (estatus ganglionar, estadío primario, edad, etc) ha podido influir en los resultados de nuestro estudio. Otra limitación de nuestro estudio, es que no se ha podido analizar el impacto de las nuevas técnicas de radioterapia conformativa como puede ser la IMRT, que a día de hoy es considerada como técnica estándar al permitir tratamientos con fraccionamiento más acelerado y disminuir la toxicidad a largo plazo (161). Por último, nuestro estudio no ha podido valorar el impacto de conocer el estatus de HPV previamente al inicio de tratamiento, y por tanto ser capaces de analizar como impactaba el resultado en la elección de la estrategia de tratamiento a realizar. Nuestro estudio también presenta limitaciones respecto a los análisis de expresión génica, como la escasa representación de los

pacientes HPV positivos, además de la falta de validación independiente de nuestros resultados en la base de datos del TCGA.

## 8. Conclusiones

- En nuestro trabajo de tesis realizado sobre una serie de 83 pacientes con tumores de cavidad oral y orofaringe localmente avanzados, irresecables y tratados con intención curativa hemos confirmado el impacto pronóstico de la positividad de HPV, en cuanto a beneficio en términos de mejor tasa de respuestas, SLP a los 3 años y SG a los 5 años para la población global del estudio, independientemente del método diagnóstico realizado (HPV-PCR o IHC-p16). Este beneficio fue estadísticamente significativo en tumores de orofaringe. No hemos podido confirmar el impacto positivo en los tumores de cavidad oral.
- La concordancia entre IHC-p16 y HPV-PCR en tumores de cavidad oral fue limitada, de forma similar a lo reportado en la literatura.
- En nuestro estudio hemos confirmado el impacto pronóstico de otros factores clínicos y tumorales clásicos, como la afectación tumoral primaria T3-T4 o estadios IV. Hemos podido reproducir los subgrupos pronósticos clínicos basados en la afectación tumoral primaria, el estatus de HPV, estadio ganglionar y el hábito tabáquico. Asimismo, hemos identificando una mayor proporción de pacientes con alto riesgo de recurrencia en los tumores de cavidad oral.
- Los pacientes con tumores que expresaron la firma génica Basal mediante la plataforma de expresión génica PAM50 tienen un peor pronóstico en SLP y en SG.
- Mediante la plataforma génica PAM50, hemos identificado genes que de forma individual se correlacionaban con pronóstico, así como genes diferentemente expresados en tumores de cavidad oral y orofaringe. Sin embargo, no hemos podido describir un patrón de expresión génica diferenciado entre los tumores HPV positivos y negativos, probablemente en relación con el número limitado de tumores HPV positivos. Nuestros resultados de expresión génica no han podido ser validados en la cohorte del TCGA de tumores de cabeza y cuello, limitando por tanto la interpretación de los resultados.

## 9. Bibliografía

1. Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. Cancer statistics, 2014. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2014;64(1):9-29.
2. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2009;18(2):541-50.
3. Simard EP, Torre LA, Jemal A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral oncology*. 2014;50(5):387-403.
4. Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez AD, Murray CJ, Ezzati M, Comparative Risk Assessment collaborating g. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 2005;366(9499):1784-93.
5. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology*. 2012;13(6):607-15.
6. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(4):612-9.
7. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(32):4294-301.
8. Anaya-Saavedra G, Ramirez-Amador V, Irigoyen-Camacho ME, Garcia-Cuellar CM, Guido-Jimenez M, Mendez-Martinez R, et al. High association of human papillomavirus infection with oral cancer: a case-control study. *Archives of medical research*. 2008;39(2):189-97.
9. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, Klussmann JP, Lee JH, Wang D, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer*. 2004;108(5):766-72.
10. Raghupathy R, Hui EP, Chan AT. Epstein-Barr virus as a paradigm in nasopharyngeal cancer: from lab to clinic. *American Society of Clinical Oncology educational book American Society of Clinical Oncology Meeting*. 2014:149-53.
11. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer research*. 1988;48(11):3282-7.
12. Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the aetiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs region of France. *European journal of cancer Part B, Oral oncology*. 1995;31B(5):301-9.
13. Lewin F, Norell SE, Johansson H, Gustavsson P, Wennerberg J, Biorklund A, et al. Smoking tobacco, oral snuff, and alcohol in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck: a population-based case-referent study in Sweden. *Cancer*. 1998;82(7):1367-75.
14. Proia NK, Paszkiewicz GM, Nasca MA, Franke GE, Pauly JL. Smoking and smokeless tobacco-associated human buccal cell mutations and their association with oral cancer--a review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006;15(6):1061-77.
15. Sapkota A, Gajalakshmi V, Jetly DH, Roychowdhury S, Dikshit RP, Brennan P, et al. Smokeless tobacco and increased risk of hypopharyngeal and laryngeal cancers: a multicentric case-control study from India. *Int J Cancer*. 2007;121(8):1793-8.
16. De Stefani E, Boffetta P, Oreggia F, Fierro L, Mendilaharsu M. Hard liquor drinking is associated with higher risk of cancer of the oral cavity and pharynx than wine drinking. A case-control study in Uruguay. *Oral oncology*. 1998;34(2):99-104.

17. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(10):777-89.
18. Druesne-Pecollo N, Tehard B, Mallet Y, Gerber M, Norat T, Hercberg S, et al. Alcohol and genetic polymorphisms: effect on risk of alcohol-related cancer. *The Lancet Oncology.* 2009;10(2):173-80.
19. Sale KA, Wallace DI, Girod DA, Tsue TT. Radiation-induced malignancy of the head and neck. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 2004;131(5):643-5.
20. Whatley WS, Thompson JW, Rao B. Salivary gland tumors in survivors of childhood cancer. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery.* 2006;134(3):385-8.
21. Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, Spitz MR, Wei Q. Glutathione-S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Int J Cancer.* 1999;84(3):220-4.
22. Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer.* 1995;63(6):769-73.
23. Kutler DI, Singh B, Satagopan J, Batish SD, Berwick M, Giampietro PF, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR). *Blood.* 2003;101(4):1249-56.
24. Cruz I, Van Den Brule AJ, Brink AA, Snijders PJ, Walboomers JM, Van Der Waal I, et al. No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels. *Int J Cancer.* 2000;86(3):356-61.
25. Shiels MS, Cole SR, Kirk GD, Poole C. A meta-analysis of the incidence of non-AIDS cancers in HIV-infected individuals. *Journal of acquired immune deficiency syndromes.* 2009;52(5):611-22.
26. Maier H, De Vries N, Snow GB. Occupational factors in the aetiology of head and neck cancer. *Clinical otolaryngology and allied sciences.* 1991;16(4):406-12.
27. Vaughan TL, Stewart PA, Davis S, Thomas DB. Work in dry cleaning and the incidence of cancer of the oral cavity, larynx, and oesophagus. *Occupational and environmental medicine.* 1997;54(9):692-5.
28. Freedman ND, Park Y, Subar AF, Hollenbeck AR, Leitzmann MF, Schatzkin A, et al. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *Int J Cancer.* 2008;122(10):2330-6.
29. Chuang SC, Jenab M, Heck JE, Bosetti C, Talamini R, Matsuo K, et al. Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Cancer causes & control : CCC.* 2012;23(1):69-88.
30. Farrow DC, Vaughan TL, Berwick M, Lynch CF, Swanson GM, Lyon JL. Diet and nasopharyngeal cancer in a low-risk population. *Int J Cancer.* 1998;78(6):675-9.
31. Silverman S, Jr., Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer.* 1984;53(3):563-8.
32. Hansen LS, Olson JA, Silverman S, Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology.* 1985;60(3):285-98.
33. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research.* 1996;56(11):2488-92.
34. Hittelman WN. Genetic instability in epithelial tissues at risk for cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2001;952:1-12.
35. Tabor MP, Braakhuis BJ, van der Wal JE, van Diest PJ, Leemans CR, Brakenhoff RH, et al. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. *The Journal of pathology.* 2003;199(3):354-60.
36. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Kummer JA, Leemans CR, Braakhuis BJ. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study.

- Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2004;10(11):3607-13.
37. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2001;7(6):1523-32.
  38. Bremner JF, Braakhuis BJ, Ruijter-Schippers HJ, Brink A, Duarte HM, Kuik DJ, et al. A noninvasive genetic screening test to detect oral preneoplastic lesions. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 2005;85(12):1481-8.
  39. Shpitzer T, Hamzany Y, Bahar G, Feinmesser R, Savulescu D, Borovoi I, et al. Salivary analysis of oral cancer biomarkers. *Br J Cancer.* 2009;101(7):1194-8.
  40. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *The New England journal of medicine.* 2008;359(11):1143-54.
  41. National Comprehensive Cancer Network. Head and Neck Cancers (Version 2.2017) [May 10, 2017]. Available from: [https://http://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/head-and-neck.pdf](https://http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/head-and-neck.pdf).
  42. Rennemo E, Zatterstrom U, Boysen M. Synchronous second primary tumors in 2,016 head and neck cancer patients: role of symptom-directed panendoscopy. *The Laryngoscope.* 2011;121(2):304-9.
  43. Tandon S, Shahab R, Benton JI, Ghosh SK, Sheard J, Jones TM. Fine-needle aspiration cytology in a regional head and neck cancer center: comparison with a systematic review and meta-analysis. *Head & neck.* 2008;30(9):1246-52.
  44. Sakata K, Hareyama M, Tamakawa M, Oouchi A, Sido M, Nagakura H, et al. Prognostic factors of nasopharynx tumors investigated by MR imaging and the value of MR imaging in the newly published TNM staging. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1999;43(2):273-8.
  45. Rasch C, Keus R, Pameijer FA, Koops W, de Ru V, Muller S, et al. The potential impact of CT-MRI matching on tumor volume delineation in advanced head and neck cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 1997;39(4):841-8.
  46. Anzai Y, Brunberg JA, Lufkin RB. Imaging of nodal metastases in the head and neck. *Journal of magnetic resonance imaging : JMRI.* 1997;7(5):774-83.
  47. Don DM, Anzai Y, Lufkin RB, Fu YS, Calcaterra TC. Evaluation of cervical lymph node metastases in squamous cell carcinoma of the head and neck. *The Laryngoscope.* 1995;105(7 Pt 1):669-74.
  48. Basu D, Siegel BA, McDonald DJ, Nussenbaum B. Detection of occult bone metastases from head and neck squamous cell carcinoma: impact of positron emission tomography computed tomography with fluorodeoxyglucose F 18. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery.* 2007;133(8):801-5.
  49. Brouwer J, de Bree R, Hoekstra OS, Golding RP, Langendijk JA, Castelijns JA, et al. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer: is chest computed tomography sufficient? *The Laryngoscope.* 2005;115(10):1813-7.
  50. Brouwer J, Senft A, de Bree R, Comans EF, Golding RP, Castelijns JA, et al. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer: is there a role for (18)FDG-PET? *Oral oncology.* 2006;42(3):275-80.
  51. Kim SY, Roh JL, Yeo NK, Kim JS, Lee JH, Choi SH, et al. Combined 18F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography and computed tomography as a primary screening method for detecting second primary cancers and distant metastases in patients with head and neck cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO.* 2007;18(10):1698-703.
  52. Schmid DT, Stoeckli SJ, Bandhauer F, Huguenin P, Schmid S, von Schulthess GK, et al. Impact of positron emission tomography on the initial staging and therapy in locoregional advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *The Laryngoscope.* 2003;113(5):888-91.
  53. Teknos TN, Rosenthal EL, Lee D, Taylor R, Marn CS. Positron emission tomography in the evaluation of stage III and IV head and neck cancer. *Head & neck.* 2001;23(12):1056-60.



54. Zanation AM, Sutton DK, Couch ME, Weissler MC, Shockley WW, Shores CG. Use, accuracy, and implications for patient management of [18F]-2-fluorodeoxyglucose-positron emission/computerized tomography for head and neck tumors. *The Laryngoscope*. 2005;115(7):1186-90.
55. Antoniou AJ, Marcus C, Subramaniam RM. Value of imaging in head and neck tumors. *Surgical oncology clinics of North America*. 2014;23(4):685-707.
56. Escott EJ. Role of positron emission tomography/computed tomography (PET/CT) in head and neck cancer. *Radiologic clinics of North America*. 2013;51(5):881-93.
57. Johansen J, Buus S, Loft A, Keiding S, Overgaard M, Hansen HS, et al. Prospective study of 18FDG-PET in the detection and management of patients with lymph node metastases to the neck from an unknown primary tumor. Results from the DAHANCA-13 study. *Head & neck*. 2008;30(4):471-8.
58. Johnson JT, Branstetter B. PET/CT in head and neck oncology: State-of-the-art 2013. *The Laryngoscope*. 2014;124(4):913-5.
59. Keller F, Psychogios G, Linke R, Lell M, Kuwert T, Iro H, et al. Carcinoma of unknown primary in the head and neck: comparison between positron emission tomography (PET) and PET/CT. *Head & neck*. 2011;33(11):1569-75.
60. Malone JP, Gerber MA, Vasireddy S, Hughes LF, Rao K, Shevlin B, et al. Early prediction of response to chemoradiotherapy for head and neck cancer: reliability of restaging with combined positron emission tomography and computed tomography. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2009;135(11):1119-25.
61. Rudmik L, Lau HY, Matthews TW, Bosch JD, Kloiber R, Molnar CP, et al. Clinical utility of PET/CT in the evaluation of head and neck squamous cell carcinoma with an unknown primary: a prospective clinical trial. *Head & neck*. 2011;33(7):935-40.
62. Stoeckli SJ, Steinert H, Pfaltz M, Schmid S. Is there a role for positron emission tomography with 18F-fluorodeoxyglucose in the initial staging of nodal negative oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2002;24(4):345-9.
63. Stuckensen T, Kovacs AF, Adams S, Baum RP. Staging of the neck in patients with oral cavity squamous cell carcinomas: a prospective comparison of PET, ultrasound, CT and MRI. *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. 2000;28(6):319-24.
64. Wensing BM, Vogel WV, Marres HA, Merks MA, Postema EJ, Oyen WJ, et al. FDG-PET in the clinically negative neck in oral squamous cell carcinoma. *The Laryngoscope*. 2006;116(5):809-13.
65. Xu G, Li J, Zuo X, Li C. Comparison of whole body positron emission tomography (PET)/PET-computed tomography and conventional anatomic imaging for detecting distant malignancies in patients with head and neck cancer: a meta-analysis. *The Laryngoscope*. 2012;122(9):1974-8.
66. Yabuki K, Tsukuda M, Horiuchi C, Taguchi T, Nishimura G. Role of 18F-FDG PET in detecting primary site in the patient with primary unknown carcinoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2010;267(11):1785-92.
67. Mehanna H, Wong WL, McConkey CC, Rahman JK, Robinson M, Hartley AG, et al. PET-CT Surveillance versus Neck Dissection in Advanced Head and Neck Cancer. *The New England journal of medicine*. 2016;374(15):1444-54.
68. Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershenwald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017;67(2):93-9.
69. Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A, et al. Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2008;134(5):536-8.
70. Byers RM. Neck dissection: concepts, controversies, and technique. *Seminars in surgical oncology*. 1991;7(1):9-13.

71. Stringer SP. Current concepts in surgical management of neck metastases from head and neck cancer. *Oncology*. 1995;9(6):547-54; discussion 54, 57-8.
72. Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, et al. Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2002;128(7):751-8.
73. Ferlito A, Silver CE, Rinaldo A. Elective management of the neck in oral cavity squamous carcinoma: current concepts supported by prospective studies. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 2009;47(1):5-9.
74. Schmitz S, Machiels JP, Weynand B, Gregoire V, Hamoir M. Results of selective neck dissection in the primary management of head and neck squamous cell carcinoma. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2009;266(3):437-43.
75. Fasanla AJ, Greene BH, Timmesfeld N, Wiegand S, Werner JA, Sesterhenn AM. A meta-analysis of the randomized controlled trials on elective neck dissection versus therapeutic neck dissection in oral cavity cancers with clinically node-negative neck. *Oral oncology*. 2011;47(5):320-4.
76. Alkureishi LW, Ross GL, Shoab T, Soutar DS, Robertson AG, Thompson R, et al. Sentinel node biopsy in head and neck squamous cell cancer: 5-year follow-up of a European multicenter trial. *Annals of surgical oncology*. 2010;17(9):2459-64.
77. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head & neck*. 2005;27(10):843-50.
78. Civantos FJ, Zitsch RP, Schuller DE, Agrawal A, Smith RB, Nason R, et al. Sentinel lymph node biopsy accurately stages the regional lymph nodes for T1-T2 oral squamous cell carcinomas: results of a prospective multi-institutional trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(8):1395-400.
79. Govers TM, Hannink G, Merkx MA, Takes RP, Rovers MM. Sentinel node biopsy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a diagnostic meta-analysis. *Oral oncology*. 2013;49(8):726-32.
80. Samant S. Sentinel node biopsy as an alternative to elective neck dissection for staging of early oral carcinoma. *Head & neck*. 2014;36(2):241-6.
81. Adelstein DJ, Ridge JA, Brizel DM, Holsinger FC, Haughey BH, O'Sullivan B, et al. Transoral resection of pharyngeal cancer: summary of a National Cancer Institute Head and Neck Cancer Steering Committee Clinical Trials Planning Meeting, November 6-7, 2011, Arlington, Virginia. *Head & neck*. 2012;34(12):1681-703.
82. Arens C. Transoral treatment strategies for head and neck tumors. *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery*. 2012;11:Doc05.
83. Richmon JD, Quon H, Gourin CG. The effect of transoral robotic surgery on short-term outcomes and cost of care after oropharyngeal cancer surgery. *The Laryngoscope*. 2014;124(1):165-71.
84. Vergez S, Lallemand B, Ceruse P, Moriniere S, Aubry K, De Mones E, et al. Initial multi-institutional experience with transoral robotic surgery. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2012;147(3):475-81.
85. Quon H, Cohen MA, Montone KT, Ziober AF, Wang LP, Weinstein GS, et al. Transoral robotic surgery and adjuvant therapy for oropharyngeal carcinomas and the influence of p16 INK4a on treatment outcomes. *The Laryngoscope*. 2013;123(3):635-40.
86. Hurtuk A, Agrawal A, Old M, Teknos TN, Ozer E. Outcomes of transoral robotic surgery: a preliminary clinical experience. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2011;145(2):248-53.
87. Hutcheson KA, Holsinger FC, Kupferman ME, Lewin JS. Functional outcomes after TORS for oropharyngeal cancer: a systematic review. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2015;272(2):463-71.

88. Oliver RJ, Clarkson JE, Conway DI, Glenny A, Macluskey M, Pavitt S, et al. Interventions for the treatment of oral and oropharyngeal cancers: surgical treatment. The Cochrane database of systematic reviews. 2007(4):CD006205.
89. Iyer NG, Tan DS, Tan VK, Wang W, Hwang J, Tan NC, et al. Randomized trial comparing surgery and adjuvant radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy in patients with advanced, nonmetastatic squamous cell carcinoma of the head and neck: 10-year update and subset analysis. *Cancer*. 2015;121(10):1599-607.
90. Salgarelli AC, Sartorelli F, Cangiano A, Pagani R, Collini M. Surgical treatment of lip cancer: our experience with 106 cases. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2009;67(4):840-5.
91. Guinot JL, Arribas L, Chust ML, Mengual JL, Garcia Miragall E, Carrascosa M, et al. Lip cancer treatment with high dose rate brachytherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2003;69(1):113-5.
92. Rodgers LW, Jr., Stringer SP, Mendenhall WM, Parsons JT, Cassisi NJ, Million RR. Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head & neck*. 1993;15(1):16-9.
93. Bell RB, Kademani D, Homer L, Dierks EJ, Potter BE. Tongue cancer: Is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2007;65(2):229-36.
94. Sessions DG, Spector GJ, Lenox J, Haughey B, Chao C, Marks J. Analysis of treatment results for oral tongue cancer. *The Laryngoscope*. 2002;112(4):616-25.
95. Zelefsky MJ, Harrison LB, Fass DE, Armstrong J, Spiro RH, Shah JP, et al. Postoperative radiotherapy for oral cavity cancers: impact of anatomic subsite on treatment outcome. *Head & neck*. 1990;12(6):470-5.
96. Huang CJ, Chao KS, Tsai J, Simpson JR, Haughey B, Spector GJ, et al. Cancer of retromolar trigone: long-term radiation therapy outcome. *Head & neck*. 2001;23(9):758-63.
97. Mendenhall WM, Morris CG, Amdur RJ, Werning JW, Villaret DB. Retromolar trigone squamous cell carcinoma treated with radiotherapy alone or combined with surgery. *Cancer*. 2005;103(11):2320-5.
98. Yorozu A, Sykes AJ, Slevin NJ. Carcinoma of the hard palate treated with radiotherapy: a retrospective review of 31 cases. *Oral oncology*. 2001;37(6):493-7.
99. Diaz EM, Jr., Holsinger FC, Zuniga ER, Roberts DB, Sorensen DM. Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa: one institution's experience with 119 previously untreated patients. *Head & neck*. 2003;25(4):267-73.
100. Robertson AG, Soutar DS, Paul J, Webster M, Leonard AG, Moore KP, et al. Early closure of a randomized trial: surgery and postoperative radiotherapy versus radiotherapy in the management of intra-oral tumours. *Clinical oncology*. 1998;10(3):155-60.
101. Bernier J, Dommenege C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;350(19):1945-52.
102. Cooper JS, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Campbell BH, Saxman SB, et al. Postoperative concurrent radiotherapy and chemotherapy for high-risk squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine*. 2004;350(19):1937-44.
103. Pignon JP, Bourhis J, Dommenege C, Designe L. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. *Meta-Analysis of Chemotherapy on Head and Neck Cancer*. *Lancet*. 2000;355(9208):949-55.
104. Pignon JP, le Maitre A, Maillard E, Bourhis J, Group M-NC. Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2009;92(1):4-14.
105. Bachaud JM, Cohen-Jonathan E, Alzieu C, David JM, Serrano E, Daly-Schweitzer N. Combined postoperative radiotherapy and weekly cisplatin infusion for locally advanced head and neck

- carcinoma: final report of a randomized trial. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 1996;36(5):999-1004.
106. Cooper JS, Zhang Q, Pajak TF, Forastiere AA, Jacobs J, Saxman SB, et al. Long-term follow-up of the RTOG 9501/intergroup phase III trial: postoperative concurrent radiation therapy and chemotherapy in high-risk squamous cell carcinoma of the head and neck. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012;84(5):1198-205.
  107. Laskar SG, Chaukar D, Deshpande M, Chatterjee A, Hawaldar RW, Chakraborty S, et al. Phase III randomized trial of surgery followed by conventional radiotherapy (5 fr/Wk) (Arm A) vs concurrent chemoradiotherapy (Arm B) vs accelerated radiotherapy (6fr/Wk) (Arm C) in locally advanced, stage III and IV, resectable, squamous cell carcinoma of oral cavity- oral cavity adjuvant therapy (OCAT): Final results (NCT00193843). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34 (suppl; abstr 6004).
  108. Datema FR, Ferrier MB, van der Schroeff MP, Baatenburg de Jong RJ. Impact of comorbidity on short-term mortality and overall survival of head and neck cancer patients. *Head & neck*. 2010;32(6):728-36.
  109. Stenson KM, Kunnavakkam R, Cohen EE, Portugal LD, Blair E, Haraf DJ, et al. Chemoradiation for patients with advanced oral cavity cancer. *The Laryngoscope*. 2010;120(1):93-9.
  110. Turner SL, Slevin NJ, Gupta NK, Swindell R. Radical external beam radiotherapy for 333 squamous carcinomas of the oral cavity--evaluation of late morbidity and a watch policy for the clinically negative neck. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 1996;41(1):21-9.
  111. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, et al. Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *The Lancet Oncology*. 2010;11(1):21-8.
  112. Department of Veterans Affairs Laryngeal Cancer Study G, Wolf GT, Fisher SG, Hong WK, Hillman R, Spaulding M, et al. Induction chemotherapy plus radiation compared with surgery plus radiation in patients with advanced laryngeal cancer. *The New England journal of medicine*. 1991;324(24):1685-90.
  113. Spaulding MB, Fischer SG, Wolf GT. Tumor response, toxicity, and survival after neoadjuvant organ-preserving chemotherapy for advanced laryngeal carcinoma. The Department of Veterans Affairs Cooperative Laryngeal Cancer Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1994;12(8):1592-9.
  114. Furness S, Glenny AM, Worthington HV, Pavitt S, Oliver R, Clarkson JE, et al. Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2010(9):CD006386.
  115. Adelstein DJ, Li Y, Adams GL, Wagner H, Jr., Kish JA, Ensley JF, et al. An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2003;21(1):92-8.
  116. Ward MC, Adelstein DJ, Bhateja P, Nwizu TI, Scharpf J, Houston N, et al. Severe late dysphagia and cause of death after concurrent chemoradiation for larynx cancer in patients eligible for RTOG 91-11. *Oral oncology*. 2016;57:21-6.
  117. Huguenin P, Beer KT, Allal A, Rufibach K, Friedli C, Davis JB, et al. Concomitant cisplatin significantly improves locoregional control in advanced head and neck cancers treated with hyperfractionated radiotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(23):4665-73.
  118. Jeremic B, Shibamoto Y, Stanisavljevic B, Milojevic L, Milicic B, Nikolic N. Radiation therapy alone or with concurrent low-dose daily either cisplatin or carboplatin in locally advanced unresectable squamous cell carcinoma of the head and neck: a prospective randomized trial. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 1997;43(1):29-37.

119. Newlin HE, Amdur RJ, Riggs CE, Morris CG, Kirwan JM, Mendenhall WM. Concomitant weekly cisplatin and altered fractionation radiotherapy in locally advanced head and neck cancer. *Cancer*. 2010;116(19):4533-40.
120. Sharma A, Mohanti BK, Thakar A, Bahadur S, Bhasker S. Concomitant chemoradiation versus radical radiotherapy in advanced squamous cell carcinoma of oropharynx and nasopharynx using weekly cisplatin: a phase II randomized trial. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21(11):2272-7.
121. Traynor AM, Richards GM, Hartig GK, Khuntia D, Cleary JF, Wiederholt PA, et al. Comprehensive IMRT plus weekly cisplatin for advanced head and neck cancer: the University of Wisconsin experience. *Head & neck*. 2010;32(5):599-606.
122. Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1999;17(1):409-22.
123. Lokich J, Anderson N. Carboplatin versus cisplatin in solid tumors: an analysis of the literature. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 1998;9(1):13-21.
124. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine*. 2010;363(1):24-35.
125. Bourhis J, Overgaard J, Audry H, Ang KK, Saunders M, Bernier J, et al. Hyperfractionated or accelerated radiotherapy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Lancet*. 2006;368(9538):843-54.
126. Nguyen-Tan PF, Zhang Q, Ang KK, Weber RS, Rosenthal DI, Soulieres D, et al. Randomized phase III trial to test accelerated versus standard fractionation in combination with concurrent cisplatin for head and neck carcinomas in the Radiation Therapy Oncology Group 0129 trial: long-term report of efficacy and toxicity. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(34):3858-66.
127. Koyfman SA, Adelstein DJ. Enteral feeding tubes in patients undergoing definitive chemoradiation therapy for head-and-neck cancer: a critical review. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2012;84(3):581-9.
128. Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, et al. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1993;11(10):1873-8.
129. Grandis JR, Tweardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer research*. 1993;53(15):3579-84.
130. Woodburn JR. The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy. *Pharmacology & therapeutics*. 1999;82(2-3):241-50.
131. Ho C. Cetuximab in locally advanced head-and-neck cancer: defining the population. *Current oncology*. 2010;17(4):48-51.
132. Lefebvre JL, Pointreau Y, Rolland F, Alfonsi M, Baudoux A, Sire C, et al. Induction chemotherapy followed by either chemoradiotherapy or bioradiotherapy for larynx preservation: the TREMPIN randomized phase II study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(7):853-9.
133. Magrini SM, Buglione M, Corvo R, Pirtoli L, Paiar F, Ponticelli P, et al. Cetuximab and Radiotherapy Versus Cisplatin and Radiotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer: A Randomized Phase II Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(5):427-35.
134. Ang KK, Zhang Q, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Sherman EJ, Weber RS, et al. Randomized phase III trial of concurrent accelerated radiation plus cisplatin with or without cetuximab for stage III to IV head and neck carcinoma: RTOG 0522. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(27):2940-50.
135. Giralt J, Trigo J, Nuyts S, Ozsahin M, Skladowski K, Hatoum G, et al. Panitumumab plus radiotherapy versus chemoradiotherapy in patients with unresected, locally advanced squamous-cell

- carcinoma of the head and neck (CONCERT-2): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(2):221-32.
136. Mesia R, Henke M, Fortin A, Minn H, Yunes Ancona AC, Cmelak A, et al. Chemoradiotherapy with or without panitumumab in patients with unresected, locally advanced squamous-cell carcinoma of the head and neck (CONCERT-1): a randomised, controlled, open-label phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2015;16(2):208-20.
  137. Siu LL, Waldron JN, Chen BE, Winquist E, Wright JR, Nabid A, et al. Effect of Standard Radiotherapy With Cisplatin vs Accelerated Radiotherapy With Panitumumab in Locoregionally Advanced Squamous Cell Head and Neck Carcinoma: A Randomized Clinical Trial. *JAMA oncology*. 2016.
  138. Martins RG, Parvathaneni U, Bauman JE, Sharma AK, Raez LE, Papagikos MA, et al. Cisplatin and radiotherapy with or without erlotinib in locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck: a randomized phase II trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(11):1415-21.
  139. Rooney M, Kish J, Jacobs J, Kinzie J, Weaver A, Crissman J, et al. Improved complete response rate and survival in advanced head and neck cancer after three-course induction therapy with 120-hour 5-FU infusion and cisplatin. *Cancer*. 1985;55(5):1123-8.
  140. Lefebvre JL, Chevalier D, Luboinski B, Kirkpatrick A, Collette L, Sahnoud T. Larynx preservation in pyriform sinus cancer: preliminary results of a European Organization for Research and Treatment of Cancer phase III trial. EORTC Head and Neck Cancer Cooperative Group. *J Natl Cancer Inst*. 1996;88(13):890-9.
  141. Forastiere AA, Zhang Q, Weber RS, Maor MH, Goepfert H, Pajak TF, et al. Long-term results of RTOG 91-11: a comparison of three nonsurgical treatment strategies to preserve the larynx in patients with locally advanced larynx cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(7):845-52.
  142. Vermorken JB, Remenar E, van Herpen C, Gorlia T, Mesia R, Degardin M, et al. Cisplatin, fluorouracil, and docetaxel in unresectable head and neck cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;357(17):1695-704.
  143. Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, Mickiewicz E, Winquist E, Gorbounova V, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;357(17):1705-15.
  144. Hitt R, Grau JJ, Lopez-Pousa A, Berrocal A, Garcia-Giron C, Irigoyen A, et al. A randomized phase III trial comparing induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy versus chemoradiotherapy alone as treatment of unresectable head and neck cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014;25(1):216-25.
  145. Cohen EE, Karrison TG, Kocherginsky M, Mueller J, Egan R, Huang CH, et al. Phase III randomized trial of induction chemotherapy in patients with N2 or N3 locally advanced head and neck cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(25):2735-43.
  146. Haddad R, O'Neill A, Rabinowits G, Tishler R, Khuri F, Adkins D, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent chemoradiotherapy (sequential chemoradiotherapy) versus concurrent chemoradiotherapy alone in locally advanced head and neck cancer (PARADIGM): a randomised phase 3 trial. *The Lancet Oncology*. 2013;14(3):257-64.
  147. Blanchard P, Bourhis J, Lacas B, Posner MR, Vermorken JB, Cruz Hernandez JJ, et al. Taxane-cisplatin-fluorouracil as induction chemotherapy in locally advanced head and neck cancers: an individual patient data meta-analysis of the meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(23):2854-60.
  148. Ghi MG, Paccagnella A, Ferrari D, Foa P, Rocca MC, Verri E, et al. Concomitant CRT or Cetuximab/RT Versus Induction Docetaxel/Cisplatin/5-FU (TPF) Followed by CRT or Cetuximab/RT in Patients with LASCCHN: A Randomized Phase III Factorial Study - Efficacy Results (NCT01086826). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(suppl; abstr 6004).

149. Geoffrois L, Martin L, Garaud P, De Raucourt D, Miny J, Maingon P, et al. Induction docetaxel platinum 5-FU (TPF) followed by cetuximab-radiotherapy (cetux-RT) versus concurrent chemo-radiotherapy (CT/RT) in patients with N2b/c-N3 non operated stage III-IV squamous cell cancer of the head and neck (SCCHN): Results of the GORTEC 2007-02 phase III randomized trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(suppl; abstr 6000).
150. Salama JK, Haddad RI, Kies MS, Busse PM, Dong L, Brizel DM, et al. Clinical practice guidance for radiotherapy planning after induction chemotherapy in locoregionally advanced head-and-neck cancer. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2009;75(3):725-33.
151. Sher DJ, Posner MR, Tishler RB, Sarlis NJ, Haddad RI, Holupka EJ, et al. Relationship between radiation treatment time and overall survival after induction chemotherapy for locally advanced head-and-neck carcinoma: a subset analysis of TAX 324. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2011;81(5):e813-8.
152. Zhong LP, Zhang CP, Ren GX, Guo W, William WN, Jr., Sun J, et al. Randomized phase III trial of induction chemotherapy with docetaxel, cisplatin, and fluorouracil followed by surgery versus up-front surgery in locally advanced resectable oral squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(6):744-51.
153. Abgral R, Querellou S, Potard G, Le Roux PY, Le Duc-Pennec A, Marianovski R, et al. Does 18F-FDG PET/CT improve the detection of posttreatment recurrence of head and neck squamous cell carcinoma in patients negative for disease on clinical follow-up? *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2009;50(1):24-9.
154. Ong SC, Schoder H, Lee NY, Patel SG, Carlson D, Fury M, et al. Clinical utility of 18F-FDG PET/CT in assessing the neck after concurrent chemoradiotherapy for Locoregional advanced head and neck cancer. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 2008;49(4):532-40.
155. Porceddu SV, Pryor DI, Burmeister E, Burmeister BH, Poulsen MG, Foote MC, et al. Results of a prospective study of positron emission tomography-directed management of residual nodal abnormalities in node-positive head and neck cancer after definitive radiotherapy with or without systemic therapy. *Head & neck*. 2011;33(12):1675-82.
156. Lee SC, Shores CG, Weissler MC. Salvage surgery after failed primary concomitant chemoradiation. *Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery*. 2008;16(2):135-40.
157. Porceddu SV, Jarmolowski E, Hicks RJ, Ware R, Weih L, Rischin D, et al. Utility of positron emission tomography for the detection of disease in residual neck nodes after (chemo)radiotherapy in head and neck cancer. *Head & neck*. 2005;27(3):175-81.
158. Richey LM, Shores CG, George J, Lee S, Couch MJ, Sutton DK, et al. The effectiveness of salvage surgery after the failure of primary concomitant chemoradiation in head and neck cancer. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2007;136(1):98-103.
159. Weber RS, Berkey BA, Forastiere A, Cooper J, Maor M, Goepfert H, et al. Outcome of salvage total laryngectomy following organ preservation therapy: the Radiation Therapy Oncology Group trial 91-11. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery*. 2003;129(1):44-9.
160. Zbaren P, Nuyens M, Curschmann J, Stauffer E. Histologic characteristics and tumor spread of recurrent glottic carcinoma: analysis on whole-organ sections and comparison with tumor spread of primary glottic carcinomas. *Head & neck*. 2007;29(1):26-32.
161. Gregoire V, Lefebvre JL, Licitra L, Felip E, Group E-E-EGW. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2010;21 Suppl 5:v184-6.
162. Steinau M, Saraiya M, Goodman MT, Peters ES, Watson M, Cleveland JL, et al. Human papillomavirus prevalence in oropharyngeal cancer before vaccine introduction, United States. *Emerging infectious diseases*. 2014;20(5):822-8.

163. Bishop JA, Lewis JS, Jr., Rocco JW, Faquin WC. HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck: An update on testing in routine pathology practice. *Seminars in diagnostic pathology*. 2015;32(5):344-51.
164. Havre PA, Yuan J, Hedrick L, Cho KR, Glazer PM. p53 inactivation by HPV16 E6 results in increased mutagenesis in human cells. *Cancer research*. 1995;55(19):4420-4.
165. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet Oncology*. 2010;11(8):781-9.
166. Hong A, Lee CS, Jones D, Veillard AS, Zhang M, Zhang X, et al. Rising prevalence of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer in Australia over the last 2 decades. *Head & neck*. 2016;38(5):743-50.
167. Gillison ML, Broutian T, Pickard RK, Tong ZY, Xiao W, Kahle L, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *Jama*. 2012;307(7):693-703.
168. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *The Journal of infectious diseases*. 2009;199(9):1263-9.
169. D'Souza G, Gross ND, Pai SI, Haddad R, Anderson KS, Rajan S, et al. Oral human papillomavirus (HPV) infection in HPV-positive patients with oropharyngeal cancer and their partners. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(23):2408-15.
170. Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Lin HY, Fulp W, Papenfuss MR, Abrahamsen M, et al. Incidence and clearance of oral human papillomavirus infection in men: the HIM cohort study. *Lancet*. 2013;382(9895):877-87.
171. Fakhry C, Rosenthal BT, Clark DP, Gillison ML. Associations between oral HPV16 infection and cytopathology: evaluation of an oropharyngeal "pap-test equivalent" in high-risk populations. *Cancer prevention research*. 2011;4(9):1378-84.
172. D'Souza G, Dempsey A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. *Preventive medicine*. 2011;53 Suppl 1:S5-S11.
173. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;356(19):1944-56.
174. Soares GR, Vieira Rda R, Pellizzer EP, Miyahara GI. Indications for the HPV vaccine in adolescents: a review of the literature. *Journal of infection and public health*. 2015;8(2):105-16.
175. Petrosky E, Bocchini JA, Jr., Hariri S, Chesson H, Curtis CR, Saraiya M, et al. Use of 9-valent human papillomavirus (HPV) vaccine: updated HPV vaccination recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 2015;64(11):300-4.
176. Garland SM, Hernandez-Avila M, Wheeler CM, Perez G, Harper DM, Leodolter S, et al. Quadrivalent vaccine against human papillomavirus to prevent anogenital diseases. *The New England journal of medicine*. 2007;356(19):1928-43.
177. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(5):342-50.
178. Urban D, Corry J, Rischin D. What is the best treatment for patients with human papillomavirus-positive and -negative oropharyngeal cancer? *Cancer*. 2014;120(10):1462-70.
179. Bratman SV, Bruce JP, O'Sullivan B, Pugh TJ, Xu W, Yip KW, et al. Human Papillomavirus Genotype Association With Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA oncology*. 2016;2(6):823-6.
180. Humans IWGotEoCRt. Human papillomaviruses. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. 1995;64:1-378.
181. Hebner CM, Laimins LA. Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity. *Reviews in medical virology*. 2006;16(2):83-97.
182. DiMaio D, Mattoon D. Mechanisms of cell transformation by papillomavirus E5 proteins. *Oncogene*. 2001;20(54):7866-73.



183. Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(18):10002-7.
184. Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(8):550-60.
185. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(1):9-22.
186. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989;243(4893):934-7.
187. Harbour JW, Luo RX, Dei Santi A, Postigo AA, Dean DC. Cdk phosphorylation triggers sequential intramolecular interactions that progressively block Rb functions as cells move through G1. *Cell*. 1999;98(6):859-69.
188. Huh K, Zhou X, Hayakawa H, Cho JY, Libermann TA, Jin J, et al. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein associates with the cullin 2 ubiquitin ligase complex, which contributes to degradation of the retinoblastoma tumor suppressor. *Journal of virology*. 2007;81(18):9737-47.
189. Khleif SN, DeGregori J, Yee CL, Otterson GA, Kaye FJ, Nevins JR, et al. Inhibition of cyclin D-CDK4/CDK6 activity is associated with an E2F-mediated induction of cyclin kinase inhibitor activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(9):4350-4.
190. McLaughlin-Drubin ME, Munger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. *Virus research*. 2009;143(2):195-208.
191. Rubin SM, Gall AL, Zheng N, Pavletich NP. Structure of the Rb C-terminal domain bound to E2F1-DP1: a mechanism for phosphorylation-induced E2F release. *Cell*. 2005;123(6):1093-106.
192. Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell*. 1993;75(3):495-505.
193. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell*. 1990;63(6):1129-36.
194. Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert review of molecular diagnostics*. 2008;8(4):405-15.
195. Haas I, Hoffmann TK, Engers R, Ganzer U. Diagnostic strategies in cervical carcinoma of an unknown primary (CUP). *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2002;259(6):325-33.
196. Isayeva T, Xu J, Ragin C, Dai Q, Cooper T, Carroll W, et al. The protective effect of p16(Ink4a) in oral cavity carcinomas: p16(Ink4A) dampens tumor invasion-integrated analysis of expression and kinomics pathways. *Mod Pathol*. 2015;28(5):631-53.
197. Rampias T, Sasaki C, Psyrris A. Molecular mechanisms of HPV induced carcinogenesis in head and neck. *Oral oncology*. 2014;50(5):356-63.
198. Deng Z, Hasegawa M, Kiyuna A, Matayoshi S, Uehara T, Agena S, et al. Viral load, physical status, and E6/E7 mRNA expression of human papillomavirus in head and neck squamous cell carcinoma. *Head & neck*. 2013;35(6):800-8.
199. Schlecht NF, Brandwein-Gensler M, Nuovo GJ, Li M, Dunne A, Kawachi N, et al. A comparison of clinically utilized human papillomavirus detection methods in head and neck cancer. *Mod Pathol*. 2011;24(10):1295-305.
200. Liang C, Marsit CJ, McClean MD, Nelson HH, Christensen BC, Haddad RI, et al. Biomarkers of HPV in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer research*. 2012;72(19):5004-13.
201. Gronhoj Larsen C, Gyldenlove M, Jensen DH, Therkildsen MH, Kiss K, Norrild B, et al. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer*. 2014;110(6):1587-94.
202. Chung CH, Zhang Q, Kong CS, Harris J, Fertig EJ, Harari PM, et al. p16 protein expression and human papillomavirus status as prognostic biomarkers of nonoropharyngeal head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(35):3930-8.

203. Harris SL, Thorne LB, Seaman WT, Hayes DN, Couch ME, Kimple RJ. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. *Head & neck*. 2011;33(11):1622-7.
204. Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Huang S, Hui A, et al. Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(36):6213-21.
205. 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(7):945-54.
206. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(27):4142-8.
207. Huang SH, Xu W, Waldron J, Siu L, Shen X, Tong L, et al. Refining American Joint Committee on Cancer/Union for International Cancer Control TNM stage and prognostic groups for human papillomavirus-related oropharyngeal carcinomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(8):836-45.
208. O'Sullivan B, Huang SH, Siu LL, Waldron J, Zhao H, Perez-Ordóñez B, et al. Deintensification candidate subgroups in human papillomavirus-related oropharyngeal cancer according to minimal risk of distant metastasis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(5):543-50.
209. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(5):736-47.
210. Hong A, Jones D, Chatfield M, Lee CS, Zhang M, Clark J, et al. HPV status of oropharyngeal cancer by combination HPV DNA/p16 testing: biological relevance of discordant results. *Annals of surgical oncology*. 2013;20 Suppl 3:S450-8.
211. 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(11):2465-72.
212. Thavaraj S, Stokes A, Guerra E, Bible J, Halligan E, Long A, et al. Evaluation of human papillomavirus testing for squamous cell carcinoma of the tonsil in clinical practice. *Journal of clinical pathology*. 2011;64(4):308-12.
213. 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(6):1332-9.
214. Cantley RL, Gabrielli E, Montebelli F, Cimbaluk D, Gattuso P, Petruzzelli G. Ancillary studies in determining human papillomavirus status of squamous cell carcinoma of the oropharynx: a review. *Pathology research international*. 2011;2011:138469.
215. Robinson M, Sloan P, Shaw R. Refining the diagnosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma using human papillomavirus testing. *Oral oncology*. 2010;46(7):492-6.
216. Hoffmann M, Tribius S, Quabius ES, Henry H, Pfannenschmidt S, Burkhardt C, et al. HPV DNA, E6\*I-mRNA expression and p16INK4A immunohistochemistry in head and neck cancer - how valid is p16INK4A as surrogate marker? *Cancer letters*. 2012;323(1):88-96.
217. Lewis JS, Jr., Thorstad WL, Chernock RD, Haughey BH, Yip JH, Zhang Q, et al. p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma: an entity with a favorable prognosis regardless of tumor HPV status. *Am J Surg Pathol*. 2010;34(8):1088-96.
218. Schache AG, Liloglou T, Risk JM, Filia A, Jones TM, Sheard J, et al. Evaluation of human papilloma virus diagnostic testing in oropharyngeal squamous cell carcinoma: sensitivity, specificity, and prognostic discrimination. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2011;17(19):6262-71.

219. Syrjanen KJ, Pyrhonen S, Syrjanen SM, Lamberg MA. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *The British journal of oral surgery*. 1983;21(2):147-53.
220. Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2014;50(5):380-6.
221. Cancer Genome Atlas N. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015;517(7536):576-82.
222. Vokes EE, Agrawal N, Seiwert TY. HPV-Associated Head and Neck Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2015;107(12):d1v344.
223. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(6):407-20.
224. Chaturvedi AK, Anderson WF, Lortet-Tieulent J, Curado MP, Ferlay J, Franceschi S, et al. Worldwide trends in incidence rates for oral cavity and oropharyngeal cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(36):4550-9.
225. O'Sullivan B, Huang SH, Su J, Garden AS, Sturgis EM, Dahlstrom K, et al. Development and validation of a staging system for HPV-related oropharyngeal cancer by the International Collaboration on Oropharyngeal cancer Network for Staging (ICON-S): a multicentre cohort study. *The Lancet Oncology*. 2016;17(4):440-51.
226. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2005;14(2):467-75.
227. Hocking JS, Stein A, Conway EL, Regan D, Grulich A, Law M, et al. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *Br J Cancer*. 2011;104(5):886-91.
228. Chung CH, Bagheri A, D'Souza G. Epidemiology of oral human papillomavirus infection. *Oral oncology*. 2014;50(5):364-9.
229. Kreimer AR, Johansson M, Waterboer T, Kaaks R, Chang-Claude J, Drogen D, et al. Evaluation of human papillomavirus antibodies and risk of subsequent head and neck cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(21):2708-15.
230. Agalliu I, Gapstur S, Chen Z, Wang T, Anderson RL, Teras L, et al. Associations of Oral alpha-, beta-, and gamma-Human Papillomavirus Types With Risk of Incident Head and Neck Cancer. *JAMA oncology*. 2016.
231. Ndiaye C, Mena M, Alemany L, Arbyn M, Castellsague X, Laporte L, et al. HPV DNA, E6/E7 mRNA, and p16INK4a detection in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Oncology*. 2014;15(12):1319-31.
232. Castellsague X, Alemany L, Quer M, Halc G, Quiros B, Tous S, et al. HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *J Natl Cancer Inst*. 2016;108(6):d1v403.
233. Chakravarthy A, Henderson S, Thirdborough SM, Ottensmeier CH, Su X, Lechner M, et al. Human Papillomavirus Drives Tumor Development Throughout the Head and Neck: Improved Prognosis Is Associated With an Immune Response Largely Restricted to the Oropharynx. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(34):4132-41.
234. Hong AM, Martin A, Armstrong BK, Lee CS, Jones D, Chatfield MD, et al. Human papillomavirus modifies the prognostic significance of T stage and possibly N stage in tonsillar cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2013;24(1):215-9.
235. Psychogios G, Alexiou C, Agaimy A, Brunner K, Koch M, Mantsopoulos K, et al. Epidemiology and survival of HPV-related tonsillar carcinoma. *Cancer medicine*. 2014;3(3):652-9.
236. Gillison ML. Human papillomavirus-related diseases: oropharynx cancers and potential implications for adolescent HPV vaccination. *The Journal of adolescent health : official publication of the Society for Adolescent Medicine*. 2008;43(4 Suppl):S52-60.

237. Settle K, Posner MR, Schumaker LM, Tan M, Suntharalingam M, Goloubeva O, et al. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. *Cancer prevention research*. 2009;2(9):776-81.
238. Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, Steinstrasser L, Upile T, Jerjes W, et al. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head & neck oncology*. 2009;1:36.
239. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(17):2102-11.
240. Vila PM, Stucken CL, Morris LG, Posner MR, Genden EM, Boffetta P, et al. Reduced impact of nodal metastases as a prognostic factor for tonsil cancer in the HPV era. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2014;271(9):2523-9.
241. Stephen JK, Chen KM, Shah V, Havard S, Lu M, Schweitzer VP, et al. Human papillomavirus outcomes in an access-to-care laryngeal cancer cohort. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2012;146(5):730-8.
242. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010;2(1):a001008.
243. Parfenov M, Peadarallu CS, Gehlenborg N, Freeman SS, Danilova L, Bristow CA, et al. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(43):15544-9.
244. Sepiashvili L, Bruce JP, Huang SH, O'Sullivan B, Liu FF, Kislinger T. Novel insights into head and neck cancer using next-generation "omic" technologies. *Cancer research*. 2015;75(3):480-6.
245. Brown CJ, Lain S, Verma CS, Fersht AR, Lane DP. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(12):862-73.
246. Lechner M, Frampton GM, Fenton T, Feber A, Palmer G, Jay A, et al. Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors. *Genome medicine*. 2013;5(5):49.
247. 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(6046):1157-60.
248. Walter V, Yin X, Wilkerson MD, Cabanski CR, Zhao N, Du Y, et al. Molecular subtypes in head and neck cancer exhibit distinct patterns of chromosomal gain and loss of canonical cancer genes. *PLoS One*. 2013;8(2):e56823.
249. Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Peadarallu CS, Stricker T, et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(3):632-41.
250. Burns MB, Temiz NA, Harris RS. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet*. 2013;45(9):977-83.
251. Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LJ, Grimm SA, Fargo D, Stojanov P, et al. An APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet*. 2013;45(9):970-6.
252. Hacker H, Tseng PH, Karin M. Expanding TRAF function: TRAF3 as a tri-faced immune regulator. *Nature reviews Immunology*. 2011;11(7):457-68.
253. Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, et al. Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(25):4170-6.
254. Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, et al. Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck

- squamous cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(16):2164-70.
255. Yu Z, Weinberger PM, Haffty BG, Sasaki C, Zerillo C, Joe J, et al. Cyclin d1 is a valuable prognostic marker in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(3):1160-6.
  256. Korzeniewski N, Spardy N, Duensing A, Duensing S. Genomic instability and cancer: lessons learned from human papillomaviruses. *Cancer letters*. 2011;305(2):113-22.
  257. 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(6046):1154-7.
  258. Pickering CR, Zhang J, Yoo SY, Bengtsson L, Moorthy S, Neskey DM, et al. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer discovery*. 2013;3(7):770-81.
  259. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer cell*. 2004;5(5):489-500.
  260. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(9):709-20.
  261. 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(4):261-9.
  262. O'Rorke MA, Ellison MV, Murray LJ, Moran M, James J, Anderson LA. Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral oncology*. 2012;48(12):1191-201.
  263. Huang SH, O'Sullivan B, Xu W, Zhao H, Chen DD, Ringash J, et al. Temporal nodal regression and regional control after primary radiation therapy for N2-N3 head-and-neck cancer stratified by HPV status. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2013;87(5):1078-85.
  264. Wang MB, Liu IY, Gornbein JA, Nguyen CT. HPV-Positive Oropharyngeal Carcinoma: A Systematic Review of Treatment and Prognosis. *Otolaryngology--head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery*. 2015;153(5):758-69.
  265. Lassen P, Primdahl H, Johansen J, Kristensen CA, Andersen E, Andersen LJ, et al. Impact of HPV-associated p16-expression on radiotherapy outcome in advanced oropharynx and non-oropharynx cancer. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2014;113(3):310-6.
  266. 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. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011;22(5):1071-7.
  267. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(12):1992-8.
  268. Lassen P, Eriksen JG, Krogdahl A, Therkildsen MH, Ulhoi BP, Overgaard M, 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. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2011;100(1):49-55.
  269. Applebaum KM, Furniss CS, Zeka A, Posner MR, Smith JF, Bryan J, et al. Lack of association of alcohol and tobacco with HPV16-associated head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2007;99(23):1801-10.
  270. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Hamsikova E, Turek LP. Tobacco and alcohol use increases the risk of both HPV-associated and HPV-independent head and neck cancers. *Cancer causes & control : CCC*. 2010;21(9):1369-78.

271. Smith EM, Rubenstein LM, Haugen TH, Pawlita M, Turek LP. Complex etiology underlies risk and survival in head and neck cancer human papillomavirus, tobacco, and alcohol: a case for multifactor disease. *Journal of oncology*. 2012;2012:571862.
272. 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(8):1813-20.
273. 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(19):3462-71.
274. 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. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(30):3365-73.
275. 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. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2012;103(1):49-56.
276. Nelson HH, Pawlita M, Michaud DS, McClean M, Langevin SM, Eliot MN, et al. Immune Response to HPV16 E6 and E7 Proteins and Patient Outcomes in Head and Neck Cancer. *JAMA oncology*. 2016.
277. Machtay M, Moughan J, Trotti A, Garden AS, Weber RS, Cooper JS, et al. Factors associated with severe late toxicity after concurrent chemoradiation for locally advanced head and neck cancer: an RTOG analysis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(21):3582-9.
278. Dok R, Kalev P, Van Limbergen EJ, Asbagh LA, Vazquez I, Hauben E, et al. p16INK4a impairs homologous recombination-mediated DNA repair in human papillomavirus-positive head and neck tumors. *Cancer research*. 2014;74(6):1739-51.
279. Huang SH, Perez-Ordóñez B, Weinreb I, Hope A, Massey C, Waldron JN, et al. Natural course of distant metastases following radiotherapy or chemoradiotherapy in HPV-related oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 2013;49(1):79-85.
280. Kimple RJ, Smith MA, Blitzer GC, Torres AD, Martin JA, Yang RZ, et al. Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer research*. 2013;73(15):4791-800.
281. Overgaard J, Eriksen JG, Nordmark M, Alsner J, Horsman MR, Danish H, et al. Plasma osteopontin, hypoxia, and response to the hypoxia sensitiser nimorazole in radiotherapy of head and neck cancer: results from the DAHANCA 5 randomised double-blind placebo-controlled trial. *The Lancet Oncology*. 2005;6(10):757-64.
282. Albers A, Abe K, Hunt J, Wang J, Lopez-Albaitero A, Schaefer C, et al. Antitumor activity of human papillomavirus type 16 E7-specific T cells against virally infected squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer research*. 2005;65(23):11146-55.
283. Heusinkveld M, Goedemans R, Briet RJ, Gelderblom H, Nortier JW, Gorter A, et al. Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer. *Int J Cancer*. 2012;131(2):E74-85.
284. Hoffmann TK, Arsov C, Schirlau K, Bas M, Friebe-Hoffmann U, Klussmann JP, et al. T cells specific for HPV16 E7 epitopes in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J Cancer*. 2006;118(8):1984-91.
285. Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, Riley C, Harris S, Suchak K, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer*. 2014;110(2):489-500.
286. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007;110(7):1429-35.
287. Samuels SE, Vainshtein J, Spector ME, Ibrahim M, McHugh JB, Tao Y, et al. Impact of retropharyngeal adenopathy on distant control and survival in HPV-related oropharyngeal cancer

- treated with chemoradiotherapy. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 2015;116(1):75-81.
288. Chera BS, Amdur RJ, Tepper J, Qaqish B, Green R, Aumer SL, et al. Phase 2 Trial of De-intensified Chemoradiation Therapy for Favorable-Risk Human Papillomavirus-Associated Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 2015;93(5):976-85.
  289. Marur S, Li S, Cmelak AJ, Gillison ML, Zhao WJ, Ferris RL, et al. E1308: Phase II Trial of Induction Chemotherapy Followed by Reduced-Dose Radiation and Weekly Cetuximab in Patients With HPV-Associated Resectable Squamous Cell Carcinoma of the Oropharynx- ECOG-ACRIN Cancer Research Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;JCO2016683300.
  290. Gildener-Leapman N, Lee J, Ferris RL. Tailored immunotherapy for HPV positive head and neck squamous cell cancer. *Oral oncology*. 2014;50(9):780-4.
  291. Goodman MT, Saraiya M, Thompson TD, Steinau M, Hernandez BY, Lynch CF, et al. Human papillomavirus genotype and oropharynx cancer survival in the United States of America. *European journal of cancer*. 2015;51(18):2759-67.
  292. Genden EM, Sambur IM, de Almeida JR, Posner M, Rinaldo A, Rodrigo JP, et al. Human papillomavirus and oropharyngeal squamous cell carcinoma: what the clinician should know. *European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies*. 2013;270(2):405-16.
  293. Rosenthal DI, Harari PM, Giralt J, Bell D, Raben D, Liu J, et al. Association of Human Papillomavirus and p16 Status With Outcomes in the IMCL-9815 Phase III Registration Trial for Patients With Locoregionally Advanced Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Treated With Radiotherapy With or Without Cetuximab. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(12):1300-8.
  294. Hong A, Dobbins T, Lee CS, Jones D, Jackson E, Clark J, et al. Relationships between epidermal growth factor receptor expression and human papillomavirus status as markers of prognosis in oropharyngeal cancer. *European journal of cancer*. 2010;46(11):2088-96.
  295. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(19):3128-37.
  296. Kumar B, Cipolla MJ, Old MO, Brown NV, Kang SY, Dziegielewski PT, et al. Surgical management of oropharyngeal squamous cell carcinoma: Survival and functional outcomes. *Head & neck*. 2016;38 Suppl 1:E1794-802.
  297. Douthwaite SA, Franklin JH, Palma DA, Fung K, Yoo J, Nichols AC. The role of transoral robotic surgery in the management of oropharyngeal cancer: a review of the literature. *ISRN oncology*. 2012;2012:945162.
  298. Cmelak AJ, Li S, Goldwasser MA, Murphy B, Cannon M, Pinto H, et al. Phase II trial of chemoradiation for organ preservation in resectable stage III or IV squamous cell carcinomas of the larynx or oropharynx: results of Eastern Cooperative Oncology Group Study E2399. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(25):3971-7.
  299. Sinha P, Lewis JS, Jr., Piccirillo JF, Kallogjeri D, Haughey BH. Extracapsular spread and adjuvant therapy in human papillomavirus-related, p16-positive oropharyngeal carcinoma. *Cancer*. 2012;118(14):3519-30.
  300. Husain ZA, Burtness BA, Decker RH. Cisplatin Versus Cetuximab With Radiotherapy in Locally Advanced Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2016;34(5):396-8.
  301. Chung CH, Guthrie VB, Masica DL, Tokheim C, Kang H, Richmon J, et al. Genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma determined by cancer gene-targeted sequencing. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2015;26(6):1216-23.

302. Tinhofer I, Budach V, Saki M, Kanschak R, Niehr F, Johrens K, et al. Targeted next-generation sequencing of locally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck reveals druggable targets for improving adjuvant chemoradiation. *European journal of cancer*. 2016;57:78-86.
303. Dowsett M, Sestak I, Lopez-Knowles E, Sidhu K, Dunbier AK, Cowens JW, et al. Comparison of PAM50 risk of recurrence score with oncotype DX and IHC4 for predicting risk of distant recurrence after endocrine therapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(22):2783-90.
304. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(8):1160-7.
305. Prat A, Adamo B, Fan C, Peg V, Vidal M, Galvan P, et al. Genomic analyses across six cancer types identify basal-like breast cancer as a unique molecular entity. *Scientific reports*. 2013;3:3544.
306. 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 oncology*. 2013;49(1):1-8.
307. Andl T, Kahn T, Pfuhl A, Nicola T, Erber R, Conradt C, et al. Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer research*. 1998;58(1):5-13.
308. Parry D, Bates S, Mann DJ, Peters G. Lack of cyclin D-Cdk complexes in Rb-negative cells correlates with high levels of p16INK4/MTS1 tumour suppressor gene product. *The EMBO journal*. 1995;14(3):503-11.
309. Seiwert TY. Ties that bind: p16 as a prognostic biomarker and the need for high-accuracy human papillomavirus testing. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(35):3914-6.
310. Licitra L, Perrone F, Bossi P, Suardi S, Mariani L, Artusi R, et al. High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2006;24(36):5630-6.
311. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebbersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer*. 2001;92(4):805-13.
312. Worden FP, Kumar B, Lee JS, Wolf GT, Cordell KG, Taylor JM, et al. Chemoselection as a strategy for organ preservation in advanced oropharynx cancer: response and survival positively associated with HPV16 copy number. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(19):3138-46.
313. Lim AM, Do H, Young RJ, Wong SQ, Angel C, Collins M, et al. Differential mechanisms of CDKN2A (p16) alteration in oral tongue squamous cell carcinomas and correlation with patient outcome. *Int J Cancer*. 2014;135(4):887-95.
314. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho CH, Lippman SM, Tsao AS. 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 oncology*. 2010;2:15.
315. Dahm-Daphi J. p53: biology and role for cellular radiosensitivity. *Strahlentherapie und Onkologie : Organ der Deutschen Rontgengesellschaft [et al]*. 2000;176(6):278-85.
316. Liu Y, McKalip A, Herman B. Human papillomavirus type 16 E6 and HPV-16 E6/E7 sensitize human keratinocytes to apoptosis induced by chemotherapeutic agents: roles of p53 and caspase activation. *Journal of cellular biochemistry*. 2000;78(2):334-49.
317. 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(12):2656-64.
318. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(4):1226-35.



319. Tribius S, Hoffmann AS, Bastrop S, Gorogh T, Haag J, Rocken C, et al. HPV status in patients with head and neck of carcinoma of unknown primary site: HPV, tobacco smoking, and outcome. *Oral oncology*. 2012;48(11):1178-84.
320. Hu Z, Zhu D, Wang W, Li W, Jia W, Zeng X, et al. Genome-wide profiling of HPV integration in cervical cancer identifies clustered genomic hot spots and a potential microhomology-mediated integration mechanism. *Nat Genet*. 2015;47(2):158-63.
321. Nien HH, Sturgis EM, Kies MS, El-Naggar AK, Morrison WH, Beadle BM, et al. Comparison of systemic therapies used concurrently with radiation for the treatment of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer. *Head & neck*. 2016;38 Suppl 1:E1554-61.
322. Zandberg DP, Strome SE. The role of the PD-L1:PD-1 pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncology*. 2014;50(7):627-32.
323. Levy A, Chargari C, Cheminant M, Simon N, Bourgier C, Deutsch E. Radiation therapy and immunotherapy: implications for a combined cancer treatment. *Critical reviews in oncology/hematology*. 2013;85(3):278-87.
324. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, Fan C, Tiganelli CJ, Wobker SE, et al. Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(8):3110-5.
325. Zhao SG, Chang SL, Erho N, Yu M, Lehrer J, Alshalalfa M, et al. Associations of Luminal and Basal Subtyping of Prostate Cancer With Prognosis and Response to Androgen Deprivation Therapy. *JAMA oncology*. 2017.
326. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
327. Wilkerson MD, Yin X, Hoadley KA, Liu Y, Hayward MC, Cabanski CR, et al. Lung squamous cell carcinoma mRNA expression subtypes are reproducible, clinically important, and correspond to normal cell types. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(19):4864-75.
328. Chatterjee A, Chang X, Sen T, Ravi R, Bedi A, Sidransky D. Regulation of p53 family member isoform DeltaNp63alpha by the nuclear factor-kappaB targeting kinase IkappaB kinase beta. *Cancer research*. 2010;70(4):1419-29.
329. De Cecco L, Bossi P, Locati L, Canevari S, Licitra L. Comprehensive gene expression meta-analysis of head and neck squamous cell carcinoma microarray data defines a robust survival predictor. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2014;25(8):1628-35.