

Carcinoma epidermoide orofaríngeo metastásico en ganglios linfáticos cervicales asociado a los subtipos 16 y 45 del virus del papiloma humano (VPH). Estudio clínico, morfológico y molecular de dos casos

Danny Soria-Céspedes^{1*}, Guadalupe Canchola Aguilar¹, César Octavio Lara-Torres¹, Juan Felipe Sánchez-Marle², Roberto Enrique Hernández-Peña² y Carlos Ortiz-Hidalgo^{1,3}

¹Departamento de Patología, Centro Médico ABC (The American British Cowdray Medical Center), México, D.F.; ²Departamento de Cirugía, Centro Médico ABC (The American British Cowdray Medical Center), México, D.F.; ³Departamento de Biología Celular y Tisular, Universidad Panamericana, México, D.F.

Resumen

El carcinoma epidermoide orofaríngeo asociado al VPH ha sido identificado como una entidad diferente dentro de los carcinomas de cabeza y cuello. A diferencia de los carcinomas asociados con alcohol y/o tabaco, este subtipo se presenta a menor edad, en ausencia de factores de riesgo, se relaciona con hábitos sexuales orales, tiene predilección por las amígdalas palatinas y la base de la lengua (amígdalas linguales), tiene diferenciación basaloide y linfoepitelial, y exhibe mayor grado de radiosensibilidad y mejor sobrevida. Se informan dos casos de carcinoma epidermoide poco diferenciado metastásico en ganglios linfáticos que fueron positivos mediante inmunohistoquímica a p16, con identificación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) del VPH-16 y 45.

PALABRAS CLAVE: VPH. Carcinoma epidermoide orofaríngeo. Metástasis ganglionar cervical.

Abstract

Human papillomavirus (HPV)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma has been identified as a distinct entity within squamous cell carcinoma of the head and neck. In contrast to carcinomas associated with alcohol and/or tobacco, this subtype occurs at younger age, with frequent absence of classic risk factors, correlation with oral sexual habits, strong predilection for the palatal tonsils and the base of the tongue (lingual tonsils), basaloid or lymphoepithelial differentiation, higher degree of radiosensitivity, and overall better survival. We report two cases of lymph node, metastatic, poorly differentiated squamous cell carcinoma that were positive by immunohistochemistry for p16 with detection of HPV-16 and HPV-45 by PCR. (Gac Med Mex. 2013;149:673-9)

Corresponding autor: Danny Soria Céspedes, drsoriac@abchospital.com

KEY WORDS: HPV. Oropharyngeal squamous cell carcinoma. Cervical lymph node metastases.

Introducción

El carcinoma epidermoide de cabeza y cuello representa, a nivel mundial, la sexta causa más común de cáncer, con una incidencia anual de 400,000 casos¹⁻³. En México constituye el 5% de todas las neoplasias^{4,5}. La

mayor parte son atribuidos al abuso de alcohol y/o tabaco; sin embargo, en los últimos años se ha reconocido la relación entre la infección por VPH de alto riesgo y el carcinoma orofaríngeo, considerando este grupo de tumores como un subtipo diferente con características clínicas, morfológicas, moleculares y terapéuticas propias⁶⁻⁸.

Los carcinomas orofaríngeos VPH positivos, a diferencia de los carcinomas orofaríngeos VPH negativos, se manifiestan a menor edad, no presentan asociación

Correspondencia:

*Danny Soria Céspedes

Sur, 136 #116

Col. Las Américas, Del. Álvaro Obregón, C.P. 01120, México, D.F.

E-mail: drsoriac@abchospital.com

Fecha de recepción: 17-08-2013

Fecha de aceptación: 19-09-2013

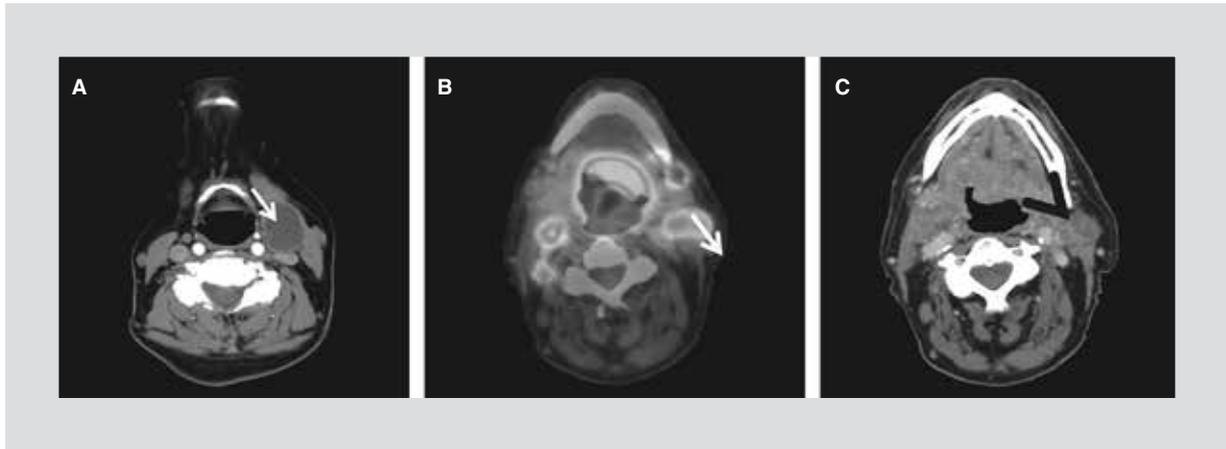


Figura 1. Paciente 1. **A:** tomografía axial computarizada que muestra una lesión cervical izquierda hipodensa y con pared adelgazada. Paciente 2. **B:** PET-CT con imagen de fusión con una lesión en la orofaringe que se extiende desde el borde posterior de la base de la lengua hacia el piso de la boca. **C:** adenopatías cervicales bilaterales con zonas hipodensas sugerentes de necrosis.

con alcohol y tabaco, se relacionan con hábitos sexuales orales, tienen predilección por las amígdalas palatinas y la base de la lengua (amígdalas linguales), morfológicamente son poco diferenciados con patrón basaloides o de tipo linfopitelial, son más radiosensibles y tienen una mejor supervivencia global¹⁻³.

El subtipo de VPH más frecuente en este grupo de carcinomas es el 16, que representa el 84-90% de todos los casos y actúa a través de las oncoproteínas E6 y E7^{1-3,9,10}. La oncoproteína E6 acelera la degradación de la p53, con la subsecuente inestabilidad genómica. La oncoproteína E7 se une a la proteína del gen de retinoblastoma, lo que permite la liberación del factor de transcripción E2F, que induce sobreexpresión de p16 en las células epiteliales infectadas. Debido a este mecanismo la expresión inmunohistoquímica de la p16 es de utilidad para el diagnóstico de este subtipo de carcinomas^{1,11}.

En este estudio presentamos dos casos de carcinoma orofaríngeo con metástasis ganglionar; uno de ellos se manifestó como metástasis quística y posteriormente se identificó como carcinoma epidermoide en la amígdala izquierda. Ambos casos fueron positivos mediante inmunohistoquímica a p16, y a través de la PCR se detectó infección por VPH de alto riesgo, subtipos 16 y 45.

Descripción de los casos

Caso 1

Mujer de 61 años sin antecedentes de importancia, cuyo padecimiento actual se inició dos meses antes del diagnóstico con faringoamigdalitis y odinofagia,

que fue tratada con antibióticos y antiinflamatorios sin respuesta favorable. Posteriormente presentó aumento de volumen de la región inframandibular izquierda, motivo por el cual se realizó una tomografía axial computarizada, en la que se encontró un aumento del volumen del hemicuello izquierdo secundario a lesión ovoide, hipodensa, sin reforzamiento ante la administración de material de contraste y con pared adelgazada, con posibilidades diagnósticas de adenopatía con componente necrótico *versus* quiste de segunda hendidura branquial (Fig. 1). Se realizó una resección de la lesión quística que fue enviada a estudio transoperatorio; medía 4.6 × 3.5 × 1 cm, presentaba una superficie externa lisa y una superficie interna granular e irregular de color café-rosa. El diagnóstico transoperatorio fue de carcinoma poco diferenciado quístico metastásico. Debido al diagnóstico emitido se exploraron de manera intencionada las amígdalas palatinas: la izquierda presentó irregularidad y mayor consistencia que la derecha, por lo que se realizó una amigdalectomía izquierda, que fue enviada a estudio transoperatorio. La pieza quirúrgica medía 3.4 × 2.5 × 1.5 cm, pesaba 5.9 g, tenía una superficie externa irregular y de color café-amarillo. La superficie de corte fue granular, con un área sólida que afectaba una zona de 1.6 cm. El diagnóstico transoperatorio fue de carcinoma epidermoide poco diferenciado de amígdala izquierda. En el estudio microscópico de los cortes definitivos se identificó un carcinoma epidermoide poco diferenciado, de aspecto basaloides, con células de citoplasma eosinófilo, de núcleos irregulares, pleomórficos, hiper cromáticos, con nucléolos ocasionales, mitosis atípicas dispersas y zonas de necrosis (Fig. 2).

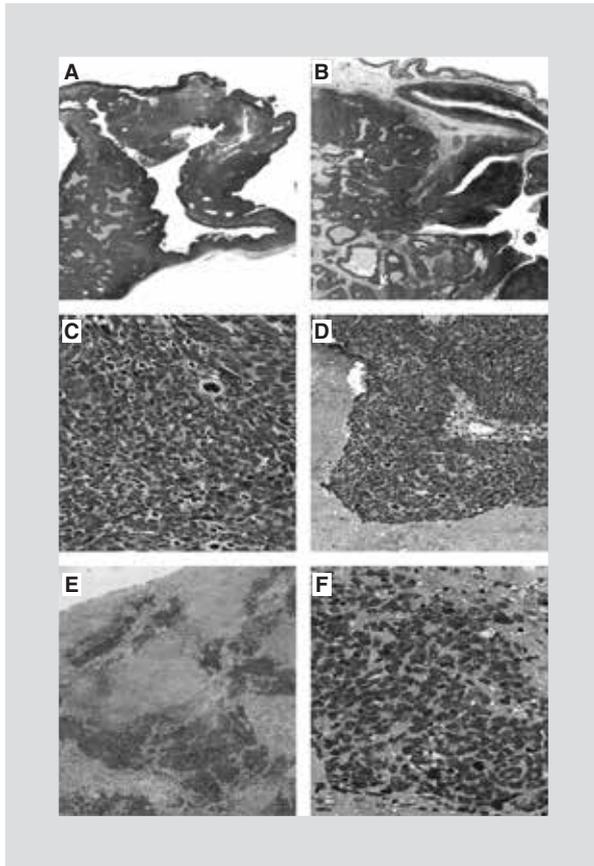


Figura 2. Paciente 1. **A:** fotomicrografía del ganglio linfático con metástasis quística de carcinoma epidermoide poco diferenciado (H y E, 10x). **B:** fotomicrografía de la amígdala palatina que presenta, hacia el lado izquierdo, carcinoma epidermoide poco diferenciado y tejido amigdalino residual a la derecha (H y E, 10x). **C y D:** carcinoma epidermoide poco diferenciado con características basaloides con mitosis atípicas y zonas de necrosis (H y E, 100x y 400x). Paciente 2. **E-F:** ganglio linfático con carcinoma epidermoide poco diferenciado metastásico, con extensas zonas de necrosis (H y E, 10x y 400x).

Mediante inmunohistoquímica las células neoplásicas resultaron positivas de manera intensa y difusa a la queratina AE1-3, a bcl-2, a p16 y a p63 (Fig. 3). Debido a la positividad especialmente de la p16, se realizó PCR para detección y tipificación de VPH, que resultó positiva 4+ (infección grave) por virus de alto riesgo 16 (Fig. 4). La paciente recibió tratamiento basado en quimioterapia (cisplatino 80 mg/m²) y radioterapia, y a los cuatro meses no se detectó recurrencia.

Caso 2

Hombre de 73 años con antecedente de tabaquismo de 50 años de evolución, cuyo padecimiento actual se inició varios meses antes con disfagia, disfonía y disnea, con presencia de lesión neoplásica en la orofaringe. Se realizó una tomografía por emisión de positrones con

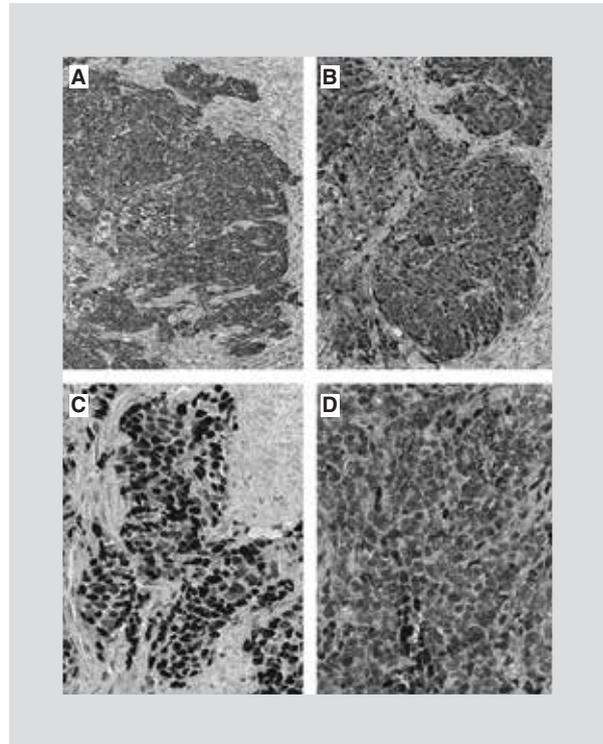


Figura 3. Inmunohistoquímica de ambos casos; las células son positivas a queratina AE1-3 (A), p16 (B), p63 (C) y bcl-2 (D).

tomografía computarizada (PET-CT) en la cual se observó una lesión en la orofaringe que se extendía del borde posterior de la base de la lengua hacia el piso de la boca, de bordes irregulares, sin disminución de la vía aérea, con *standardized uptake values* (SUV) máximo de 16.3. Además, se detectaron múltiples adenopatías cervicales bilaterales en los niveles I, II, III y IV, con zonas hipodensas sugerentes de necrosis (Fig. 1). Se realizó una biopsia de uno de los ganglios cervicales de mayor tamaño, que fue enviada a estudio transoperatorio, donde se diagnosticó como carcinoma poco diferenciado con extensas zonas de necrosis. En los cortes definitivos se identificó un carcinoma poco diferenciado, con patrón sólido, con células de citoplasma escaso y eosinófilo, de núcleos pleomórficos, hiper cromáticos, con nucléolos ocasionales, mitosis atípicas dispersas y extensas zonas de necrosis (Fig. 2). Las células neoplásicas fueron positivas, mediante inmunohistoquímica, a la queratina AE1-3, bcl-2, p16 y p63 (Fig. 3). Debido a las características morfológicas y de inmunohistoquímica, se realizó una PCR para detección y tipificación de VPH, que resultó positiva 3+ (infección moderada) por virus de alto riesgo 45 (Fig. 4). El paciente fue tratado con traqueostomía y gastrostomía; posteriormente se perdió para el seguimiento.

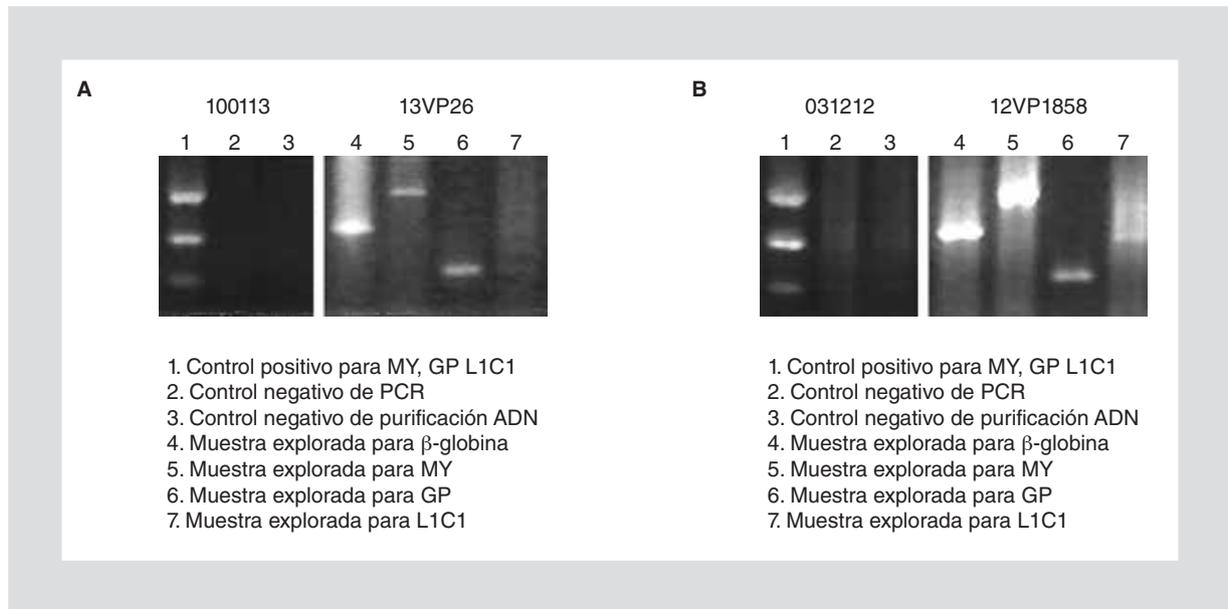


Figura 4. PCR con tres juegos de oligos universales con método de tipificación por secuenciación con resultado positivo para VPH 16 (paciente 1 [A]) y 45 (paciente 2 [B]).

Discusión

Más del 5% de los carcinomas escamosos/epidermoides son producidos por una infección del VPH; entre ellos se encuentran el carcinoma cervicouterino, los carcinomas anogenitales (vagina, vulva, pene y ano) y un grupo de neoplasias de cabeza y cuello que corresponden a los carcinomas orofaríngeos, que afectan casi exclusivamente a las amígdalas palatinas y la base de la lengua (amígdalas linguales)¹¹. Este grupo de tumores representa un subtipo diferente a los carcinomas de la cavidad oral VPH negativos, asociados a tabaquismo y alcoholismo, ya que tienen características clínicas, morfológicas, moleculares, pronósticas y terapéuticas propias (Tabla 1)^{1,6,7,12,13}.

Los primeros investigadores que detectaron la presencia del VPH en carcinomas de la cavidad oral a través de hibridación con *Southern blot* fueron Löning, et al., en 1985, seguidos de Brandsma y Abramson^{14,15}. Estos tipos de carcinomas inicialmente son pequeños; sin embargo, se asocian con un alto índice de metástasis ganglionar cervical en el momento del diagnóstico (65-93%), que en la mayor parte de los casos corresponden a ganglios de gran tamaño con cambios quísticos, que si están compuestos por carcinoma bien diferenciado, pueden confundirse con quistes branquiales^{1,3,8}. Cuando el carcinoma aparece primero como metástasis ganglionar cervical, el tumor primario generalmente se encuentra localizado en la amígdala lingual o palatina, como

describieron originalmente Micheau, et al., del Instituto Gustave Roussy de Francia¹⁶. En un estudio realizado en el año 2008 por Goldenberg, et al. se observó que en el 85% de las metástasis quísticas en ganglios linfáticos de cabeza y cuello el tumor primario estaba localizado en las amígdalas palatinas o linguales, y el 84% de estos pacientes fueron positivos para VPH¹². Zengel, et al. realizaron la detección mediante la PCR del VPH en 26 pacientes con metástasis en los ganglios linfáticos cervicales sin conocer inicialmente el sitio primario; posteriormente se detectó que este estaba localizado en las amígdalas palatinas y en la base de la lengua¹. El 81% de estos casos tuvieron sobreexpresión de p16, con detección molecular de VPH de alto riesgo en el 83% de los casos de carcinoma que afectó a las amígdalas y en el 79% de los casos de carcinomas localizados en la base de la lengua. Los subtipos más comunes fueron el 16 (18 casos), el 33 (2 casos) y el 58 (1 caso)¹.

En un estudio realizado en México por Gallegos-Hernández, et al. se vio que, de un universo de 118 pacientes con carcinoma de cabeza y cuello, el 42.37% tuvieron infección por VPH detectada mediante la PCR, el 70% de los cuales estuvo relacionado con virus de alto riesgo 16. Dieciocho casos de esta serie se localizaron en la orofaringe, y en seis se identificó infección por VPH de alto riesgo⁴.

Por otra parte, hay distintos estudios que efectuaron detección de VPH en amígdalas mediante PCR en pacientes sin carcinoma orofaríngeo. Ernster, et al.

Tabla 1. Características clínicas e histopatológicas en el carcinoma orofaríngeo VPH positivo y el carcinoma orofaríngeo VPH negativo

Carcinoma orofaríngeo VPH positivo	Carcinoma orofaríngeo VPH negativo
Edad más temprana	Mayores de 55 años
Sin historia de tabaquismo	Historia de consumo de alcohol y/o tabaco
Hábitos sexuales de alto riesgo	Con o sin hábitos sexuales de alto riesgo
Sin mutación de TP53	Mutación de TP53
Morfología de carcinoma poco diferenciado: basaloide y linfoepitelial	Carcinoma epidermoide convencional, bien o moderadamente diferenciado
Zonas de necrosis	Puede presentar zonas de necrosis o no
Ganglios linfáticos con metástasis quísticas	Ganglios linfáticos con metástasis sólidas
Mejor respuesta al tratamiento	Peor respuesta al tratamiento
Mejor pronóstico y mayor tiempo de supervivencia	Peor pronóstico y menor tiempo de supervivencia

utilizaron la PCR para VPH-16 y 18 en 226 pacientes, y en ninguno se identificó genoma viral⁹. Syrjänen recopiló datos de varios estudios y detectó un total de 8.5% de amígdalas sin carcinoma con infección por VPH¹⁷. Sisk, et al. informaron de una incidencia del 2% de infección por VPH en amígdalas con inflamación crónica y Chen, et al. reportaron una incidencia del 6.3%^{18,19}. Sin embargo, el riesgo absoluto de carcinoma orofaríngeo en pacientes con infección por VPH es desconocido; los estudios descritos señalan que deben existir cofactores para poder generar carcinoma^{2,11}.

El mecanismo de infección del VPH se inicia con el contacto obligatorio con las células de la capa basal, que puede verse facilitado por las características estructurales de la porción basal del epitelio críptico amigdalino²⁰. El genoma viral codifica dos proteínas reguladoras (E1 y E2), tres oncoproteínas (E5, E6 y E7) y dos proteínas estructurales de la cápside (L1 y L2)^{1,2,9}. El ciclo de vida del VPH es complejo; en la infección temprana el ADN viral se presenta como forma episomal con un número de copias bajo en la capa basal del epitelio. El ADN viral es amplificado y rodeado por cápside solo en células epiteliales que han terminado su diferenciación^{2,21}. Datos recientes indican que el establecimiento de la infección inicial está fuertemente ligado a la progresión del ciclo celular en la fase de mitosis, específicamente en la fase temprana de la profase^{2,21}. La oncoproteína E5 juega un papel importante durante la etapa temprana de infección al unirse al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), al receptor β del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR- β) y al receptor del factor

estimulante de colonias-1 (CSF-1) para promover la proliferación celular^{2,22}. Sin embargo, de manera habitual, la secuencia que codifica la oncoproteína E5 se pierde durante la integración al genoma, pero se piensa que E5 no es necesaria para la carcinogénesis final; este papel lo cumplen las oncoproteínas E6 y E7².

La oncoproteína E6 forma un complejo con la proteína asociada a E6 a través de una ligasa ubiquitina E3, con ubiquitinación de la p53, que induce la degradación acelerada de esta proteína supresora tumoral, con pérdida de la regulación de los puntos de control G1/S y G2/M, generando inestabilidad genómica^{2,23}. La oncoproteína E7 se une al complejo ligasa ubiquitina cullina 2, y produce la ubiquitinación de la proteína del gen de retinoblastoma (pRb), que induce su degradación con pérdida de control de la fase G1/S. En ausencia de pRb la familia de los factores de transcripción E2F se libera y se produce la transcripción de genes de la fase S, dando lugar a la proliferación celular^{2,24}.

Estudios recientes señalan que no solamente las oncoproteínas E6 y E7 se limitan a unirse a la p53 y pRb, sino que existen otras moléculas a las que se unen con efectos complementarios en la carcinogénesis². Por ejemplo, la E7 se une a las proteínas p107, p130, a los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina p21 y p27 que inducen proliferación descontrolada. La E6 incrementa la actividad de la telomerasa que genera inmortalización celular y además se une a proteínas antiapoptóticas como Bak².

A pesar de todos los mecanismos en los que están implicadas las oncoproteínas E6 y E7, se considera que su expresión no es suficiente en el proceso de la

carcinogénesis y que se requieren otros factores, hasta el momento no conocidos, para generar carcinoma².

Desde el punto de vista morfológico, los carcinomas asociados a VPH son generalmente carcinomas poco diferenciados con patrón basaloides y linfoepitelial, lo que apoyaría aún más el origen en el epitelio de las criptas amigdalinas. Mediante inmunohistoquímica, uno de los marcadores que son útiles en el diagnóstico y sospecha de infección por VPH de alto riesgo es la p16, que refleja el efecto de la oncoproteína E7; por ello se recomienda el uso de este anticuerpo en casos de carcinoma epidermoide metastásico en ganglios linfáticos, como marcador de detección de infección de VPH, acompañado de estudios moleculares^{2,3}.

Los dos casos aquí presentados mostraron la localización habitual de este subtipo de carcinomas: el primero en la amígdala palatina y el segundo en la base de la lengua. El primer caso se manifestó con crecimiento ganglionar y, mediante estudios de imagenología, se identificó una lesión de aspecto quístico con diagnósticos diferenciales que incluían ganglio linfático con zonas de necrosis o quiste branquial. En el segundo caso, el paciente presentó una lesión que afectaba a la base de lengua, con crecimiento de ganglios linfáticos cervicales, sin cambios quísticos, pero con extensas zonas de necrosis.

Morfológicamente ambos resultaron carcinomas epidermoides poco diferenciados con células de núcleos hiper cromáticos con mitosis atípicas dispersas. Mediante inmunohistoquímica mostraron positividad a marcadores epiteliales/epidermoides (queratina AE1-3 y p63, respectivamente). Además, un dato característico fue la expresión intensa y difusa tanto nuclear como citoplasmática de la p16, que refleja el mecanismo de acción de la oncoproteína E7. De igual manera, el bcl-2, que es una proteína antiapoptótica, resultó positivo, intenso y difuso en las células neoplásicas. Debido a las características morfológicas y de inmunohistoquímica, se realizó una búsqueda de la infección por VPH mediante la PCR, que en ambos casos resultó positiva para virus de alto riesgo (16 y 45).

Debido a la evidencia descrita en los distintos estudios, se demuestra una asociación clara entre la infección del VPH de alto riesgo y el carcinoma orofaríngeo. Por este motivo, en este punto surge el concepto de la prevención primaria y/o secundaria. Kreimer y Chaturvedi analizaron este aspecto y llegaron a la conclusión de que un tamizaje con estudio citológico de la orofaringe no es útil como método de detección de lesiones preneoplásicas y que la eficacia de la vacuna no ha sido aún probada¹¹.

En cuanto al tratamiento y sobrevida de los pacientes con infección por VPH, Fakhry, et al. realizaron un estudio prospectivo en 96 pacientes en estadio III o IV de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, y el 40% presentaron infección por VPH y recibieron dos ciclos de inducción de quimioterapia con paclitaxel intravenoso y carboplatino, seguidos de paclitaxel intravenoso semanal y radioterapia estándar fraccionada. En comparación con los casos VPH negativos, los pacientes con VPH positivos tuvieron una mayor tasa de respuesta tanto con la inducción con quimioterapia (82 vs 55%) como con el tratamiento posterior con quimio y radioterapia (84 vs 57%). Después de un seguimiento de 39 meses, los pacientes VPH positivos tuvieron mayor sobrevida global en comparación con el grupo VPH negativo (95 vs 62%)²⁵. Un estudio retrospectivo realizado por Sedaghat, et al. demostró que pacientes con carcinoma de cabeza y cuello e infección por VPH tienen mejor respuesta al tratamiento con quimioterapia y radioterapia, en relación con el control local de la enfermedad y mayor sobrevida global y libre de enfermedad²⁶. En un estudio retrospectivo realizado en 179 pacientes del Centro Nacional Siglo XXI de la Ciudad de México, Flores-de la Torre, et al. vieron que la infección por VPH en pacientes con carcinoma de cabeza y cuello no tuvo valor pronóstico; sin embargo, debido a que este hecho está ampliamente demostrado en varias publicaciones, llegaron a la conclusión de que el universo de estudio debe ser mayor para obtener resultados indiscutibles²⁷.

Como conclusión, ante la presencia de carcinoma poco diferenciado metastásico en ganglios linfáticos de cabeza y cuello, especialmente si tienen cambios quísticos y zonas de necrosis, se deberá considerar la posibilidad de estar frente a este subtipo de carcinoma orofaríngeo asociado a VPH, y se deberá sugerir, como probable sitio primario, las amígdalas palatinas o la base de la lengua.

Bibliografía

1. Zengel P, Assmann G, Mollenhauer M, et al. Cancer of unknown primary originating from oropharyngeal carcinomas are strongly correlated to HPV positivity. *Virchows Arch.* 2012;461:283-90.
2. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2009;15:6758-62.
3. McHugh JB. Association of cystic neck metastases and human papillomavirus-positive oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133:1798-803.
4. Gallegos-Hernández JF, Paredes-Hernández E, Flores-Díaz R, Minauro-Muñoz G, Apresa-García T, Hernández-Hernández DM. Virus del papiloma humano asociado con cáncer de cabeza y cuello. *Cir Cir.* 2007;75:151-5.
5. Dirección General de Epidemiología. Registro histopatológico de cáncer. México: Secretaría de Salud; 2002.
6. Tachezy R, Klozar J, Saláková M, et al. HPV and other risk factors of oral cavity/ oropharyngeal cancer in the Czech Republic. *Oral Diseases.* 2005;11:181-5.

7. Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, et al. Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*. 2009;119:1542-9.
8. Hocking JS, Stein A, Conway EL, 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;104:886-91.
9. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, Robinson LJ, Willson T. Prevalence of oncogenic human papillomavirus 16 and 18 in the palatine tonsils of the general adult population. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2009;135:554-7.
10. Anantharaman D, Gheit T, Waterboer T, et al. Human papillomavirus infections and upper aero-digestive tract cancers: the ARCAGE study. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(8):536-45.
11. Kreimer AR, Chaturvedi AK. HPV-associated oropharyngeal cancers-are they preventable? *Cancer Prev Res*. 2011;4:1346-9.
12. Goldenberg D, Begum S, Westra WH, et al. Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: an HPV-associated phenomenon. *Head Neck*. 2008;30:898-903.
13. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human Papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol*. 2011;29:4294-301.
14. Löning T, Ikenberg H, Becker J, et al. Analysis of oral papillomas, leukoplakias, and invasive carcinomas for human papillomavirus type related DNA. *J Invest Dermatol*. 1985;84:417-20.
15. Brandsma JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1989;115:621-5.
16. Micheau C, Cachin Y, Caillou B. Cystic metastases in the neck revealing occult carcinoma of the tonsil. A report of six cases. *Cancer*. 1974;33:228-33.
17. Syrjänen S. HPV infections and tonsillar carcinoma. *J Clin Pathol*. 2004;57:449-55.
18. Sisk J, Schweinfurth JM, Wang XT, Chong K. Presence of human papillomavirus DNA in tonsillectomy specimens. *Laryngoscope*. 2006;116:1372-4.
19. Chen R, Cehr P, Waterboer T, et al. Presence of DNA of human papillomavirus 16 but no other types in tumor-free tonsillar tissue. *J Clin Microbiol*. 2005;43:1408-10.
20. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14:467-75.
21. Pyeon D, Pearce SM, Lank SM, Ahlquist P, Lambert PF. Establishment of human papilloma virus infection requires cell cycle progression. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000318.
22. Hwang ES, Nottoli T, Dimaio D. The HPV16 E5 protein: expression, detection, and stable complex formation with transmembrane proteins in COS cells. *Virology*. 1995;211:227-33.
23. 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;63:1129-36.
24. Huh K, Zhou X, Hayakawa H, 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. *J Virol*. 2007;81:9737-47.
25. Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:261-9.
26. Sedaghat AR, Zhang Z, Begum S, et al. Prognostic significance of human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Laryngoscope*. 2009;119:1542-9.
27. Flores-de la Torre C, Hernández-Hernández DM, Gallegos- Hernández JF. El virus de papiloma huma como factor pronóstico en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. *Cir Cir*. 2010;78:221-8.