

# Presencia De Virus Papiloma Humano En Displasia Epitelial Oral Y Carcinoma Oral De Células Escamosas: Revisión Sistemática

Jorge Celis Dooner<sup>1\*</sup>, Isidora Mujica Valenzuela<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudiante de Pregrado, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

<sup>2</sup> Cirujano dentista, Profesor Instructor, Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

\*Correspondencia: Jorge Celis, Monseñor Álvaro del Portillo 12455, Santiago, Región Metropolitana; jacelis@miuandes.cl, +56979689345

Recibido: 22 de Octubre de 2020; Aceptado: 26 de Noviembre de 2020; Publicado: 31 de Diciembre de 2020.

## RESUMEN

Objetivos: Describir si el virus papiloma humano debe considerarse un factor de riesgo para desarrollar displasia epitelial oral y carcinoma oral de células escamosas. Material y Método. Se realizó una revisión de la literatura entre los meses de julio y agosto de 2020, en las bases de datos *PubMed*, *Elsevier*, *EBSCO* y *Cochrane*. Resultados. Se observó que la prevalencia de virus papiloma humano en displasia epitelial oral varía entre un 0% a 100% en las distintas poblaciones. La prevalencia de virus papiloma humano en carcinoma oral de células escamosas varía entre 0% a 83%. Conclusión. Con la literatura disponible hasta la fecha, no es posible determinar si el virus papiloma humano debe ser considerado un factor de riesgo para el desarrollo de displasia epitelial oral y

carcinoma oral de células escamosas, pero no se descarta su participación como factor de riesgo, por lo que se recomienda realizar investigaciones bajo un protocolo unificado.

## PALABRAS CLAVES

Infección por virus papiloma humano, Carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, Displasia epitelial oral.

## INTRODUCCIÓN

El virus papiloma humano (VPH) es un virus DNA de aproximadamente 8.000 pares de bases. Se describen 205 genotipos diferentes que se categorizan en 5 géneros, siendo Alphapapillomavirus el de mayor relevancia clínica por su participación en lesiones de mucosas [1]; a su vez, estos se clasifican en VPH de bajo riesgo y alto riesgo [2], según la capacidad de expresar proteínas carcinogénicas, como E6 y E7, capaces de desregular el ciclo celular. De este modo, los de bajo riesgo causan que no se asocian a riesgo de malignización; mientras que los de alto riesgo sí (por ejemplo, los serotipos 16 y 18 están fuertemente asociados a cáncer cérvicouterino) [3]. Se ha observado que factores como número de parejas sexuales, sexo masculino y nivel socioeconómico bajo, son predictores de infección por VPH del alto riesgo [4]. Si bien la infección por VPH de alto riesgo es un factor etiológico y de riesgo para el desarrollo de carcinoma de cuello uterino, ano-genital y de orofaringe [5]; su relación con displasia epitelial oral (DEO) y carcinoma oral de células escamosas (COCE) todavía es controversial [6] y requiere ser estudiada, ya que, si bien la mayoría de los desórdenes orales epiteliales potencialmente malignos y

COCE se asocian a factores de riesgo como tabaquismo y consumo de alcohol, [7] se ha observado un aumento en la prevalencia de estas patologías en pacientes sin estos factores de riesgo. En este contexto, se ha propuesto que la infección por VPH podría participar de la carcinogénesis oral [8–12].

Uno de los métodos más comunes para la detección de VPH es la detección inmunohistoquímica (IHQ) de la proteína p16, que es una reguladora del ciclo celular y está sobreexpresada en la infección por VPH [13]. Múltiples estudios han demostrado que la tinción de p16 no es suficiente para el diagnóstico, ya que en un gran porcentaje de los casos se puede obtener un falso positivo, lo que hace que sea necesario recurrir a métodos más rigurosos como la reacción de polimerasa en cadena (*polimerase chain reaction*, PCR por sus siglas en inglés) y/o hibridación in situ (HIS) [14–16].

En base a la información disponible en la literatura se planteó la siguiente pregunta de investigación: ¿es el VPH un factor de riesgo para el desarrollo de displasia epitelial oral y carcinoma oral de células escamosas?

El objetivo general de esta revisión es describir si el VPH es un factor de riesgo para el desarrollo de DEO y COCE.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se realizó una revisión de la literatura entre los meses de julio y agosto del 2020, en las bases de datos *PubMed*, *Elsevier*, *EBSCO* y *Cochrane*, incluyendo artículos que cumplieran los siguientes criterios de inclusión; (a) diseño de estudio correspondiente a cohortes, caso-control y series de casos; (b) comprobación de infección por VPH a través de inmunohistoquímica o algún método de detección genómica; (c) publicado desde el 2010 en adelante; (d) segmento anatómico estudiado correspondiente a la cavidad oral; (e) estar escrito en inglés o español. Se excluyeron todos los artículos que no realizaron biopsia de las lesiones orales.

Como palabras claves se utilizaron los siguientes términos *Mesh*: "*Precancerous Conditions*", "*Mouth*", "*Papillomavirus Infections*", "*Carcinoma, Squamous Cell*", "*Leukoplakia, Oral*" y el término libre "*dysplasia*". De esta forma se generaron las siguientes estrategias de búsqueda: ["*Precancerous Conditions*"][*Mesh*) AND "*Mouth*"][*Mesh*) AND "*Papillomavirus Infections*"][*Mesh*], ["*Papillomavirus Infections*"][*Mesh*) AND "*Mouth*"][*Mesh*) AND "*dysplasia*"], ["*Papillomavirus Infections*"][*Mesh*) AND "*Mouth*"][*Mesh*) AND "*Carcinoma, Squamous Cell*"][*Mesh*] y ["*Leukoplakia,*

*Oral*"][*Mesh*) AND "*Papillomavirus Infections*"][*Mesh*].

## RESULTADOS

La sumatoria de las estrategias de búsqueda arrojó 578 resultados totales (tabla 1). Se eliminaron 84 duplicados, y se obtuvieron 494 resultados originales. De estos, 40 artículos fueron seleccionados según título y resumen para lectura en texto completo. 16 artículos fueron finalmente incluidos en esta revisión. Se revisaron las referencias de los artículos seleccionados, pero ningún nuevo artículo fue incluido de este modo (figura 1).

1. Reportes: De la totalidad de artículos incluidos, 9 corresponden a serie de casos (56%) y 7 a caso-control (43%). 8 fueron publicados en Asia (50%), 4 en América Latina (25%), 3 en Norte América (19%) y 1 en Europa (6%). Las fechas de publicación varían entre el año 2010 y 2020.

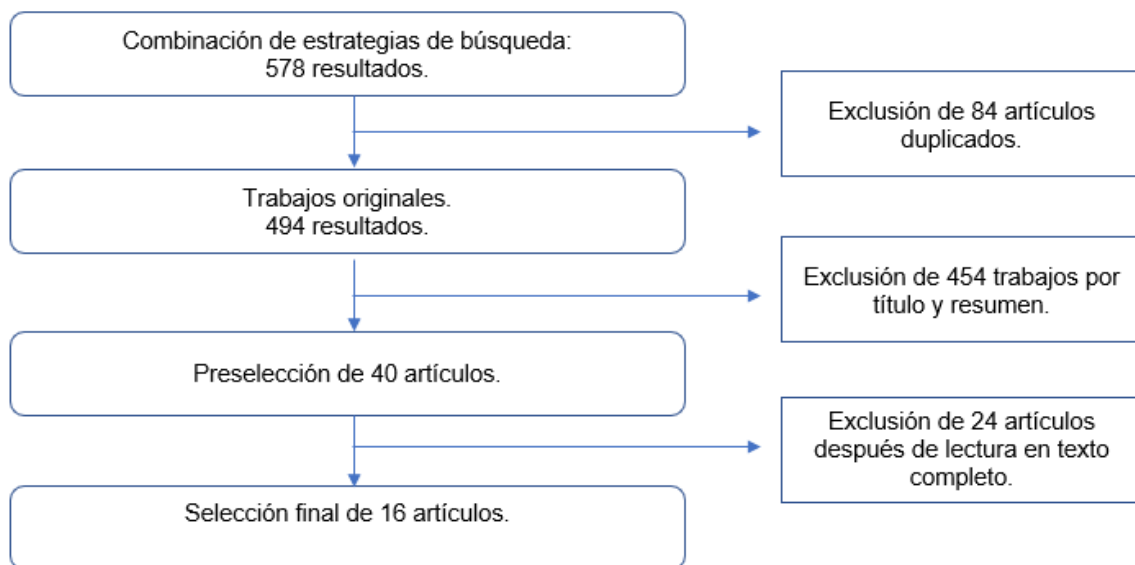
2. Pacientes: En esta revisión se incluyeron 16 artículos que suman en su totalidad 1.639 pacientes de diferentes países. De estos, 1.190 corresponden a hombres y 326 a mujeres. Es importante destacar que un estudio no reporta la distinción por sexo. Respecto a las edades, se pudo observar diferentes promedios que van desde los 34 años hasta los 63 años; solo 3 estudios no reportaron este dato. Se recopiló la existencia de antecedentes médicos previos, donde se observó que solo 3 artículos reportaron esto, variando así entre 0% hasta 50%. Por último, se registró el porcentaje de pacientes que

tuvieran el hábito de fumar tabaco, registrándose un mínimo de 33% y un máximo de 89%. 4 reportes no entregaron esta información (tabla 2).

3. Lesiones: Se evaluó el porcentaje de lesiones positivas para VPH, diferenciando si estaban asociadas a VPH de alto o bajo riesgo. De esta forma, se observó que 14 artículos reportaron un rango de positividad para VPH

de alto riesgo entre 0% a 100%. Por otro lado, solo 4 de estos lo hicieron para VPH de bajo riesgo, variando entre 0% a 59%. Luego se recopiló la prevalencia específica de COCE positivo para VPH, donde se pudo observar que 9 estudios presentaron datos que varían entre 0% hasta 83%. Por último, 9 reportes presentaron la prevalencia de DEO positiva para VPH, entregando datos entre 0% hasta 100% (tabla 2).

**Figura N°1: Diagrama de flujo de selección de artículos incluidos en esta revisión**



4. Métodos de diagnóstico: Para comprobar la infección, 13 estudios utilizaron la técnica de PCR (81%), donde solo 2 de estos usaron qPCR (reacción de polimerasa en cadena en tiempo real), mientras que el resto utilizó PCR convencional o RT-PCR. Por otro lado, 5 artículos utilizaron HIS para la detección del tipo específico de VPH (31%). Por

último, 6 estudios aplicaron IHQ para complementar el diagnóstico (38%), mientras que solo 1 recurrió a éste como método único (tabla 2).

## DISCUSIÓN

1. Epidemiología del VPH: Múltiples estudios realizados en Estados Unidos estiman que el VPH está presente en la mucosa oral de entre un 5 a un 12% de la población general. La población infectada se distribuye de forma bimodal respecto a la edad, con un primer peak entre los 30 y 34 años y un segundo peak entre los 60 y 64 años. Asimismo, se han descrito factores de riesgo para la infección

oral por VPH, como sexo masculino, múltiples parejas sexuales, tabaquismo e infección previa por VIH [4,17]. Los resultados obtenidos en esta revisión difieren de lo reportado anteriormente en relación a la edad, esto se debe principalmente a que la epidemiología varía según la población estudiada. Respecto al sexo se observa una prevalencia superior en hombres (72%) respecto a mujeres, lo que es concordante con lo reportado por la literatura [4].

**Tabla N°1: Estrategias de búsqueda y resultados**

<b>Estrategia</b>	<b>Resultado</b>
<i>PUBMED: "Precancerous Conditions"[Mesh] AND "Mouth"[Mesh] AND "Papillomavirus Infections"[Mesh]</i>	57
<i>"Papillomavirus Infections"[Mesh] AND "Mouth"[Mesh] AND "dysplasia"</i>	32
<i>"Papillomavirus Infections"[Mesh] AND "Mouth"[Mesh] AND "Carcinoma, Squamous Cell"[Mesh]</i>	99
<i>"Leukoplakia, Oral"[Mesh] AND "Papillomavirus Infections"[Mesh]</i>	119
<i>COCHRANE: "Precancerous Conditions" AND "Mouth"AND "Papillomavirus Infections"</i>	0
<i>Papillomavirus Infections AND "Mouth" AND "dysplasia"</i>	0
<i>"Papillomavirus Infections" AND "Carcinoma, Squamous Cell"</i>	1
<i>Papillomavirus infection AND leukoplakia</i>	1
<i>EBSCO: "Precancerous Conditions" AND "Mouth"AND "Papillomavirus Infections"</i>	16
<i>Papillomavirus Infections AND "Mouth" AND "dysplasia"</i>	15
<i>"Papillomavirus Infections" AND "Carcinoma, Squamous Cell"</i>	189
<i>Papillomavirus infection AND leukoplakia</i>	7
<i>ELSEVIER: "Precancerous Conditions" AND "Mouth"AND "Papillomavirus Infections"</i>	9
<i>Papillomavirus Infections AND "Mouth" AND "dysplasia"</i>	20
<i>"Papillomavirus Infections" AND "Carcinoma, Squamous Cell"</i>	6
<i>Papillomavirus infection AND leukoplakia</i>	7
<b>Total</b>	<b>578</b>

El 50% de los estudios incluidos en esta revisión fueron realizados en Asia, correspondiendo a un 70% de los pacientes incluidos. El resto de los artículos incluidos provienen de América Latina, Norte América y

Europa. Esto no se relaciona con la positividad para VPH, donde el porcentaje más alto se encuentra en América Latina y el más bajo en Europa. Es importante destacar que no hay un consenso en la prevalencia de VPH a nivel

mundial, probablemente debido a las diferentes metodologías utilizadas en los reportes. En general, la literatura coincide en que la infección por VPH sería menos frecuente en el Asia Continental que en Estados Unidos, por ejemplo, y que esta

diferencia se podría deber a diferencias culturales en el comportamiento sexual y al acceso a educación sexual. No existen aún estudios genéticos claros que relacionen raza y predisposición a infección por VPH [18].

**Tabla N°2: Aspectos generales de los artículos incluidos**

Ref	n	Edad promedio	Sexo	Antecedente MP	Fumadores	PCR	Tipo de PCR	IHQ	HIS	VPH-AR	VPH-BR	COCE VPH+	DEO VPH+
(34)	81	-	-	-	-	L1/VPH 16	qPCR	-	-	30%	-	38%	-
(35)	31	55	H: 31 M: 0	29%	68%	L1	PCR	-	VPH 6,11,16,18	32%	16%	42%	-
(20)	59	60	H:32 M:27	-	-	L1/VPH 16,18,31,33	PCR	-	-	5%	-	-	0%
(22)	106	55	H:41 M:19	-	50%	VPH 16	PCR	p16/pRb/ p53	VPH 16	27%	-	48%	-
(37)	78	53	H: 39 M: 23	-	53%	p16/ L1/ VPH16,18	PCR/MSP	p16	-	50%	-	-	65%
(38)	333	51	H:316 M:17	-	87%	L1/ EasyChip®	PCR	-	-	21%	-	21%	-
(33)	410	52	H:391 M:19	-	68%	L1/ EasyChip®	PCR	-	-	15%	6%	21%	-
(39)	77	58	H:46 M:31	-	-	-	-	p16/K6-7	HPV III Family 16 probe HPV II Family 6 probe	9%	0%	-	9%
(40)	148	60	H:76 M:72	-	47%	-	-	p16	-	-	-	-	7%
(41)	97	47	H:84 M:13	-	89%	VPH 16,18	PCR	-	-	0%	-	0%	-
(42)	80	-	H:44 M:36	-	-	L1/VPH 16,18/E6/E7/p16	PCR/RT- PCR/MSP	p53/p16/ pRb/K6-7	-	11%	-	11%	-
(43)	21	-	H:6 M:15	-	33%	L1/ VPH 6,11,16,18	PCR	-	-	29%	59%	83%	81%
(44)	50	34	H:31 M:19	-	38%	VPH 16,18	qPCR	-	-	0%	-	-	0%
(45)	56	56	H:35 M:21	0%	75%	L1/VPH 6,11,16,18,31,33	PCR	-	-	-	-	-	15%
(46)	20	63	H:6 M:14	50%	60%	-	-	p16/ p53	VPH 16, 18	0%	-	0%	0%
(47)	12	57	H:12 M:0	-	67%	VPH 16,18	RT-PCR	p16/K67	VPH 16, 18	100%	0%	100%	0%

Antecedentes MP: Antecedentes médicos previos. PCR: Reacción de polimerasa en cadena. IHQ: Inmunohistoquímica. HIS: Hibridación in situ. VPH-AR: virus papiloma humano de alto riesgo en el total de la muestra. VPH-BR: virus papiloma humano de bajo riesgo en el total de la muestra. COCE VPH+: Carcinoma oral de células espinosas positivo para virus papiloma humano. DEO VPH+: Displasia epitelial oral positiva para virus papiloma humano. qPCR: reacción de polimerasa en cadena en tiempo real. H: hombres. M: Mujeres. VPH: virus papiloma humano. pRb: proteína retinoblastoma. MSP: reacción de polimerasa en cadena con metilación específica. RT-PCR: reacción de polimerasa en cadena con transcriptasa reversa.

## 2. Métodos diagnósticos

2.1 PCR: En un 81% de los casos se utilizó la técnica de PCR para la detección de VPH, esto se debe a su alta especificidad. En la actualidad existen diferentes variantes de este método, lo que responde a la gran cantidad de aplicaciones que posee [19]. En esta revisión se pudo observar que un 66% de los reportes utilizaron solamente PCR convencional, la cual es capaz de detectar y sirve para genotipificar el virus, pero no entrega información sobre la carga viral o el estado replicativo de este, lo que cobra gran importancia, debido a que hasta el día de hoy no hay parámetros para determinar si lo observado corresponde a una infección productiva, crónica o latente [1]. Por otro lado, un 17% de los artículos utilizaron qPCR para detección de E6 y E7, la cual es capaz de entregar información cuantitativa de la infección, determinando así una imagen más acertada de la realidad [20]. Por último, un 18% utilizó RT-PCR para detección de E6 y E7. Así, el ensayo con PCR convencional permite la genotipificación pero no la detección de proteínas relacionadas a la infección viral, como L1, E6 y E7 (tabla 2). L1 es una proteína de la cápside viral que es traslocada al núcleo de los queratinocitos infectados (de la capa media y superficial). Las oncoproteínas E6 y E7 son proteínas que tienen como blanco p53 y pRB; de modo que E6 inhibe a p53, impidiendo la apoptosis del queratinocito infectado, y E7 inhibe a pRB, impidiendo el arresto del ciclo celular. La detección de transcritos de mRNA de E6 y E7 mediante qPCR o RT-PCR es recomendable

para completar la genotipificación viral, ya que indican que el VPH no sólo está presente sino que está transcripcionalmente activo [1,21].

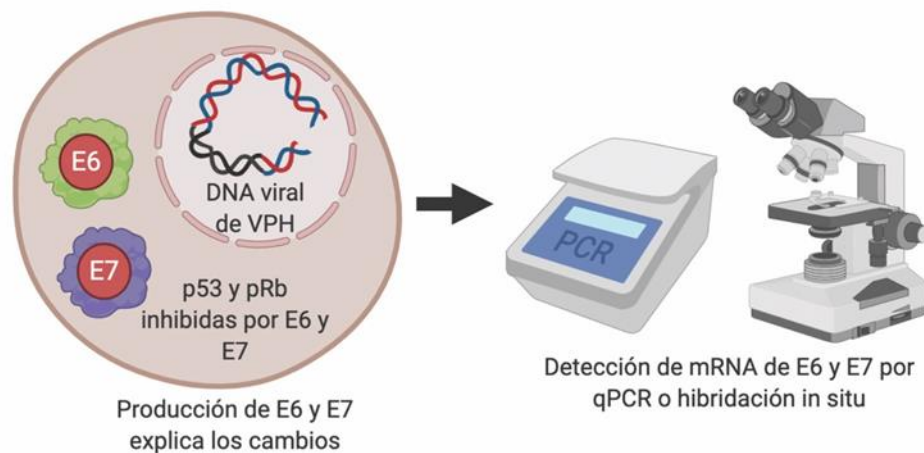
2.2 Hibridación in situ: De los artículos incluidos, 5 utilizaron esta técnica para la obtención de datos, de los cuales 2 de estos también recurrieron a PCR de forma simultánea. Chung-Feng Hwang y cols. amplificaron la región L1 altamente conservada para VPH, para luego utilizar HIS en las muestras positivas [22]. Por su parte, Kalavathy J. E y cols utilizaron PCR para la detección de VPH 16, con el fin de tener la confirmación de la presencia del virus, para luego recurrir a HIS para evaluar el estado transcripcional del VPH [20]. Por último, 2 reportes utilizaron solo HIS, sin recurrir a PCR. Todos los artículos que utilizaron HIS utilizaron sondas para DNA, con el objetivo de poder identificar la integración de genoma viral al genoma celular. Este protocolo entrega información respecto a la presencia de VPH, pero no sobre su estado en la célula hospedera. Para obtener más información se recomienda utilizar sondas para mRNA específicas de E6 y E7 de los virus 16 y 18, con el objetivo de determinar la producción viral de proteínas oncogénicas. Así, una ventaja de la HIS frente a los ensayos de PCR es que se puede realizar en muestras fijadas en formalina para la detección de transcritos de mRNA de oncoproteínas, permitiendo detectar en la muestra fijada en formalina al virus transcripcionalmente activo, con sensibilidad cercana al 100%; mientras que una

desventaja de la HIS es que no está ampliamente disponible [42,43] (figura 2).

2.3 Inmunohistoquímica: 7 artículos utilizaron IHQ, de los cuales 6 lo hicieron acompañada de PCR o HIS, solo uno recurrió a este método de forma única. De esta forma se analizó la presencia de las proteínas celulares ki-67, pRb, p53 y p16. Estas se ven

alteradas en el proceso de carcinogénesis, pero p16 se ha relacionado directamente con la infección de VPH. La IHQ para p16 se utiliza para detectar VPH de alto riesgo transcripcionalmente activo en muestras fijadas en formalina, ya que la oncoproteína E7 induce la sobreexpresión de la proteína supresora de tumores p16. Si bien este método

Figura N°2: Detección de VPH



VPH: virus papiloma humano. qPCR: reacción de polimerasa en cadena en tiempo real.

La integración de DNA viral no es suficiente para explicar los cambios epiteliales, por lo que se propone la detección específica de las proteínas E6 y E7, responsables del potencial carcinogénico, a través de qPCR o hibridación *in situ*. Creado con BioRender.com.

es económico y simple, múltiples estudios han determinado que p16 no es un marcador confiable para el diagnóstico de VPH, por lo que no se recomienda su utilización de forma individual, ya que no hay una relación biológica exclusiva entre su sobreexpresión, la infección por VPH de alto riesgo y la carcinogénesis oral [14–16].

3. Displasia epitelial oral y VPH: 9 artículos reportaron datos sobre DEO y VPH. En estos se pudo observar prevalencias discordantes, variando entre 0% a 100%. Es importante destacar que el estudio que determinó porcentajes más elevados presenta la muestra más acotada en toda esta revisión, lo que es un sesgo importante, por lo que sus



resultados deben ser ratificados con la literatura disponible. La posible participación de VPH en DEO todavía es incierta. Sandra Janeth Perdomo-Lara y cols concluyen que es común encontrar VPH de alto riesgo en DEO [25]. Por el contrario, E Blioumi y cols no encuentran relación entre estos, pero concluyen que no se debe desestimar una posible relación en casos con alta carga viral o en estados iniciales de la carcinogénesis [26]. Una reciente revisión sistemática y metaanálisis determinó que la prevalencia de VPH en DEO rodea el 27,2%, y que este porcentaje aumenta conforme aumenta la gravedad de la displasia. También, se concluyó que el tipo más común es el 16 (69%) seguido por el 18 (14%), ambos considerados de alto riesgo, por lo que no se debe descartar su participación en los cambios epiteliales [27].

4. Carcinoma oral de células escamosas y VPH: Al igual que para la displasia epitelial, la participación de VPH en el desarrollo de COCE no está bien determinada. En esta revisión, 9 estudios informaron prevalencias de VPH en COCE, con resultados heterogéneos. Estos resultados concuerdan con la literatura disponible, donde se maneja una gran variedad de información. Por ejemplo, una revisión sistemática publicada el año 2005 determinó que la prevalencia de VPH en COCE era un 23,5% y que Asia presentaba los datos más alarmantes [28]. Por su parte, N Termine y cols en el año 2008, en la revisión sistemática más completa disponible a la fecha, determinaron que la prevalencia de VPH en COCE era de un 39,9% (29). Un porcentaje

mayor es reportado en una revisión sistemática del año 2012, que concluyó una prevalencia de un 58% de COCE positivo para VPH en China [30].

Múltiples estudios han determinado que VPH podría ser un factor pronóstico para el tratamiento de COCE, postulando que los carcinomas positivos para este virus presentarían una mejor respuesta frente a la terapia, en comparación a aquellos carcinomas negativos para VPH [31,32]. Sin embargo, el artículo realizado por Li-Ang Lee y cols concluye que el pronóstico para los pacientes con COCE positivo para VPH de bajo riesgo es peor que el de aquellos positivos para VPH de alto riesgo; pero el grupo de investigadores no es capaz de explicar esta relación y fomenta futuras investigaciones que aborden este dato [33].

## CONCLUSIÓN

De acuerdo con la información disponible en la literatura, no es posible postular con certeza si el VPH debe ser considerado un factor de riesgo para el desarrollo de displasia epitelial oral y/o carcinoma oral de células escamosas. Sin embargo, no se debe descartar su participación y se recomienda realizar estudios con mayor nivel de evidencia para comprobarlo. La prevalencia de VPH en DEO y COCE es heterogénea y varía dependiendo de la población estudiada y el método utilizado para su detección. Se recomienda generar un protocolo unificado frente a la sospecha de

VPH en este tipo de lesiones. Para futuras investigaciones, se recomienda realizar HIS o qPCR en muestras de DEO y COCE con características histológicas sugerentes de infección por VPH, con el fin de obtener más datos sobre la presencia y actividad transcripcional del VPH en estas lesiones.

## ABSTRACT

Objectives: To describe if human papilloma virus should be considered a risk factor for the development of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. Material and methods. A literature review was conducted between July and August 2020, using PubMed, Cochrane, EBSCO and Elsevier. Results. Prevalence of human papilloma virus in oral epithelial dysplasia is inconsistent between different populations, varying between 0% and 100%. Similarly, the prevalence of human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma varies between 0% and 83%, demonstrating the great amount of data that currently exists. Conclusion. According to the literature available to date, it is not possible to determine if human papilloma virus should be considered a risk factor for the development of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma; although it's role in carcinogenesis isn't excluded, therefore, a unified protocol should be developed for future research.

## KEY WORDS

*Papillomavirus Infections. Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck. Oral epithelial dysplasia.*

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Syrjänen S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci.* 2018;126(S1):49-66.
2. Cianfriglia F, Di Gregorio DA, Cianfriglia C, Marandino F, Perrone Donnorso R, Vocaturo A. Incidence of human papillomavirus infection in oral leukoplakia. Indications for a viral aetiology. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2006;25(1):21-8.
3. Mittal S, Banks L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. *Mutat Res Mutat Res.* 2017;772:23-35.
4. Orosco RK, Kedarisetty S, Hecht AS, Chang DC, Coffey CS, Weissbrod PA. Predictors of high-risk and low-risk oral HPV infection in the United States. *The Laryngoscope.* 2016;126(6):1365-72.
5. Goon PK, Stanley MA, Ebmeyer J, Steinsträsser L, Upile T, Jerjes W, et al. HPV & head and neck cancer: a descriptive update. *Head Neck Oncol.* 2009;1:36.
6. Tran N, Rose BR, O'Brien CJ. Role of human papillomavirus in the etiology of head and neck cancer. *Head Neck.* 2007;29(1):64-70.

7. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol*. 2011;2011:603740.
8. Chocolatewala NM, Chaturvedi P. Role of human papilloma virus in the oral carcinogenesis: an Indian perspective. *J Cancer Res Ther*. 2009;5(2):71-7.
9. Morbini P, Bello BD, Alberizzi P, Mannarini L, Mevio N, Bertino G, et al. Exfoliated cells of the oral mucosa for HPV typing by SPF10 in head and neck cancer. *J Virol Methods*. 2012;186(1-2):99-103.
10. 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.
11. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2013;49(1):1-8.
12. Nemes JA, Deli L, Nemes Z, Márton JJ. Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(3):344-52.
13. Wagner, S., Prigge, ES., Wuerdemann, N. et al. Evaluation of p16INK4a expression as a single marker to select patients with HPV-driven oropharyngeal cancers for treatment de-escalation. *Br J Cancer*. 2020; 123, 1114–1122.
14. Boscolo-Rizzo P, Pawlita M, Holzinger D. From HPV-positive towards HPV-driven oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Cancer Treat Rev*. 2016;42:24-9.
15. Prigge E-S, Arbyn M, von Knebel Doeberitz M, Reuschenbach M. Diagnostic accuracy of p16INK4a immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer*. 2017;140(5):1186-98.
16. Nauta IH, Rietbergen MM, van Bokhoven A a. JD, Bloemena E, Lissenberg-Witte BI, Heideman D a. M, et al. Evaluation of the eighth TNM classification on p16-positive oropharyngeal squamous cell carcinomas in the Netherlands and the importance of additional HPV DNA testing. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. 2018;29(5):1273-9.
17. Chaturvedi AK, Graubard BI, Broutian T, Xiao W, Pickard RKL, Kahle L, et al. Prevalence of Oral HPV Infection in Unvaccinated Men and Women in the United States, 2009-2016. *JAMA*. 2019;322(10):977.
18. Akogbe GO, Ajidahun A, Sirak B, Anic GM, Papenfuss MR, Fulp WJ, et al. Race and prevalence of human papillomavirus infection among men residing in Brazil, Mexico, and the United States. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2012;131(3):E282.
19. Wang H, Kim H, Park S, Park KH, Lee H. Analytical performance evaluation of the HPV OncoCheck assay for detection of high-risk HPV infection in liquid-based cervical samples. *Exp Mol Pathol*. 2019;106:149-56.

20. Bradford EL, Christie CR, Campbell EM, Bowman AS. A real-time PCR method for quantification of the total and major variant strains of the deformed wing virus. *PLOS ONE*. 2017;12(12):e0190017.
21. Thammaiah S, Venkobaroo MC, Sathyavanthan H, Mirnalini AS. Quantitative polymerase chain reaction-based detection of HPV 16 E6 and E7 DNA in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2018;47(9):873-9.
22. Hwang C-F, Huang C-C, Chien C-Y, Huang S-C, Yang C-H, Su C-Y. Human papillomavirus infection in oral papillary and verrucous lesions is a prognostic indicator of malignant transformation. *Cancer Epidemiol*. 2012;36(2):e122-7.
23. Daneshpajouhnejad P, Miller JA, Maleki Z. Diagnostic utility of high-risk human papillomavirus mRNA in situ hybridisation in squamous cell carcinoma of unknown primary in the head and neck and implementing American Society of Clinical Oncology guideline recommendations. *Cytopathology*. 2020 Nov;31(6):547-554.
24. Lewis Jr. JS, Beadle B, Bishop JA, Chernock RD, Colasacco C, Lacchetti C, et al. Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med*. 2018;142(5):559-97.
25. Perdomo-Lara SJ, Buenahora MR, Álvarez E, González-Martínez F, Rebolledo M, Aristizabal FA, et al. Human papilloma virus genotypes in dysplasia and epithelial hyperplasia of oral cavity using the luminex xmap technology. A multicenter study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2020;25(1):e61-70.
26. Blioumi E, Chatzidimitriou D, Pazartzi C, Katopodi T, Tzimagiorgis G, Emmanouil-Nikoloussi E-N, et al. Detection and typing of human papillomaviruses (HPV) in malignant, dysplastic, nondysplastic and normal oral epithelium by nested polymerase chain reaction, immunohistochemistry and transitional electron microscopy in patients of northern Greece. *Oral Oncol*. 2014;50(9):840-7.
27. de la Cour CD, Sperling CD, Belmonte F, Syrjänen S, Verdoodt F, Kjaer SK. Prevalence of human papillomavirus in oral epithelial dysplasia: Systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2020;hed.26330.
28. Kreimer AR. Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):467-75.
29. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, Lo Muzio L, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988–2007). *Ann Oncol*. 2008;19(10):1681-90.
30. Zhu C, Ling Y, Dong C, Zhou X, Wang F. The relationship between oral squamous cell carcinoma and human papillomavirus: a meta-analysis of a Chinese population (1994-2011). *PLoS One*. 2012;7(5):e36294.

31. 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.
32. Klozar J, Kratochvil V, Salakova M, Smahelova J, Vesela E, Hamsikova E, et al. HPV status and regional metastasis in the prognosis of oral and oropharyngeal cancer. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2008;265(1):75-82.
33. Lee L-A, Huang C-G, Tsao K-C, Liao C-T, Kang C-J, Chang K-P, et al. Increasing rates of low-risk human papillomavirus infections in patients with oral cavity squamous cell carcinoma: Association with clinical outcomes. *J Clin Virol.* 2013;57(4):331-7.
34. Lee SY, Cho NH, Choi EC, Baek SJ, Kim WS, Shin DH, et al. Relevance of human papilloma virus (HPV) infection to carcinogenesis of oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39(7):678-83.
35. Saghravani N, Ghazvini K, Babakoohi S, Firooz A, Mohtasham N. Low prevalence of high risk genotypes of human papilloma virus in normal oral mucosa, oral leukoplakia and verrucous carcinoma. *Acta Odontol Scand.* 2011;69(6):406-9.
36. Elango KJ, Suresh A, Erode EM, Subhadradevi L, Ravindran HK, Iyer K, et al. Role of Human Papilloma Virus in Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2011;12(4):889-96.
37. Fonseca-Silva T, Farias LC, Cardoso CM, de Souza LR, de Carvalho Fraga CA, de Oliveira MVM, et al. Analysis of p16CDKN2A Methylation and HPV-16 Infection in Oral Mucosal Dysplasia. *Pathobiology.* 2012;79(2):94-100.
38. Lee L-A, Huang C-G, Liao C-T, Lee L-Y, Hsueh C, Chen T-C, et al. Human Papillomavirus-16 Infection in Advanced Oral Cavity Cancer Patients Is Related to an Increased Risk of Distant Metastases and Poor Survival. Medeiros R, editor. *PLoS ONE.* 2012;7(7):e40767.
39. McCord C, Xu J, Xu W, Qiu X, McComb RJ, Perez-Ordóñez B, et al. Association of high-risk human papillomavirus infection with oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;115(4):541-9.
40. Nankivell P, Williams H, Webster K, Pearson D, High A, MacLennan K, et al. Investigation of p16 INK 4a as a prognostic biomarker in oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(4):245-9.
41. Patel KR, Vajaria BN, Begum R, Desai A, Patel JB, Shah FD, et al. Prevalence of high-risk human papillomavirus type 16 and 18 in oral and cervical cancers in population from Gujarat, West India. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(4):293-7.
42. Reyes M, Rojas-Alcayaga G, Pennacchiotti G, Carrillo D, Muñoz JP, Peña N, et al. Human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas from Chilean patients. *Exp Mol Pathol.* 2015;99(1):95-9.
43. Bhargava A, Shakeel M, Srivastava A, Raza T, Rizvi S, Varshney P. Role of human

papilloma virus in oral leukoplakia. Indian J Cancer. 2016;53(1):206.

44. Ribeiro MGM, Marcolino LD, Ramos BR de A, Miranda EA, Trento CL, Jain S, et al. High prevalence of human papillomavirus (HPV) in oral mucosal lesions of patients at the Ambulatory of Oral Diagnosis of the Federal University of Sergipe, Northeastern Brazil. J Appl Oral Sci. 2017;25(1):69-74.

45. Ferreira LL, Biasoli ÉR, Bernabé DG, Nunes CM, Miyahara GI. Plasma HPV DNA is detectable in oral leukoplakia patients. Pathol - Res Pract. 2017;213(7):759-65.

46. Upadhyaya JD, Fitzpatrick SG, Islam MN, Bhattacharyya I, Cohen DM. A Retrospective 20-Year Analysis of Proliferative Verrucous Leukoplakia and Its Progression to Malignancy and Association with High-risk Human Papillomavirus. Head Neck Pathol. 2018;12(4):500-10.

47. Alsabbagh A, Robins TL, Harriman A, Jackson-Boeters L, Darling MR, Khan ZA, et al. Surrogate markers for high-risk human papillomavirus infection in oral epithelial dysplasia: A comparison of p16, Ki-67, and ProExC. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2020;129(3):246-259.e1.