

Biopsia en carcinoma escamoso de orofaringe

Sebastián Castro^{1,2,a}, Felipe Carvajal^{3,4}, Felipe Cardemil^{2,3}

Biopsy in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma

Oropharyngeal squamous cell carcinoma biopsy is a fundamental step in the diagnosis; therefore, it is relevant to know its different types. Currently, four types of biopsy are recognized for this type of carcinoma, each of which has specific indications: incisional biopsy, excisional biopsy, fine needle aspiration (FNA), and liquid biopsy. The most frequent and recommended procedure is incisional biopsy, because of its speed and low associated morbidity. Both excisional biopsy and FNA are reserved for cases of cervical metastasis of unknown primary depending on the stage of analysis of the particular patient. Finally, there is a strong development in liquid biopsy, especially through the study of the cHPV-DNA biomarker, which is a sensitive and specific marker for this type of carcinoma, and may change the diagnostic paradigm in the near future.

Keywords: squamous cell carcinoma; oropharynx; types of biopsy; liquid biopsy.

Resumen

La biopsia en carcinoma escamoso de orofaringe es un paso fundamental para su diagnóstico, por lo que es relevante conocer los diferentes tipos de ésta. Actualmente, se reconocen 4 tipos de biopsia en este tipo de carcinoma, cada uno de las cuales presentan indicaciones específicas: Biopsia incisional, excisional, punción con aguja fina (PAF) y biopsia líquida. La más frecuente y recomendada es la biopsia incisional por su rapidez y poca morbilidad asociada. Tanto la biopsia excisional como la PAF se reservan para casos de metástasis cervical de primario desconocido dependiendo de la etapa del análisis del paciente en particular. Finalmente, existe un fuerte desarrollo de la biopsia líquida, especialmente mediante el estudio del biomarcador cHPV-DNA, el cual al ser un marcador sensible y específico para este tipo de carcinoma puede cambiar el paradigma del diagnóstico en un futuro cercano.

Palabras clave: carcinoma escamoso; orofaringe; tipos de biopsia; biopsia líquida.

¹Servicio de Otorrinolaringología, Hospital San José. Santiago Chile.

²Departamento de Otorrinolaringología, Clínica Las Condes. Santiago Chile.

³Departamento de Oncología Básico-Clínica, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Santiago Chile.

⁴C.R. Radioterapia, Instituto Nacional Del Cáncer. Santiago Chile.

^a<https://orcid.org/0000-0002-4829-6547>

Recibido el 2023-03-10 y aceptado para publicación el 2023-04-24.

Correspondencia a:

Correspondencia a:
Dr. Sebastián Castro
sebastian.castro@ug.uchile.cl

Introducción

El carcinoma escamoso de orofaringe (CEOF) es un tipo de cáncer derivado de la mucosa de la vía aéreo-digestiva superior, específicamente, desde la orofaringe. Es un cáncer infrecuente en la población, con una incidencia estimada a nivel mundial de 98.412 casos, correspondiendo a menos del 1% a de todos los cánceres a nivel mundial, según GLOBOCAN 2020¹.

En relación con la situación de Centro y Sudamérica, Perdomo y colaboradores el 2016 observaron que la incidencia para cáncer de cavidad oral y de faringe varía en esta región, siendo Brasil el país con mayores tasas de incidencia para ambos sexos; 19,7 y 5,0/100.000 habitantes para hombres y mu-

jes, respectivamente. En particular en Chile, no existen datos epidemiológicos sobre la incidencia de CEOF².

La importancia de este tipo de cáncer es por el incremento sostenido de su incidencia, especialmente en países desarrollados. Esto ha sido refrendado en estudios epidemiológicos que han mostrado que en Estados Unidos, esta entidad ha presentado un incremento de su incidencia de 225% entre los años 1988-2004, junto con una disminución concomitante del CEOF no relacionado con virus papiloma humano (VPH) en un 50% en este mismo período de tiempo³.

El CEOF se clasifica en dos grandes grupos dependiendo de su etiología, aquellos relacionados con virus papiloma humano y aquellos no relacionados

con VPH. Esto es relevante, debido a que presenta implicancias tanto clínicas como pronósticas entre ambos grupos, presentando un mejor pronóstico el relacionado con VPH.

La manera de realizar biopsias en este tipo de carcinoma es fundamental para lograr un diagnóstico precoz de esta enfermedad. En este sentido, distinguimos actualmente 4 grandes abordajes para el diagnóstico de carcinoma de orofaringe: biopsia incisional, biopsia excisional, punción con aguja fina y biopsia líquida. Cada una de estas técnicas presentan ventajas y desventajas, por lo que el objetivo de esta revisión narrativa es dar cuenta del estado del arte acerca del método diagnóstico de CEOF.

Biopsia de tumor primario

Biopsia incisional

El CEOF es un carcinoma de tipo epitelial, por lo que generalmente es evidente en la superficie de la localización en la cual se inserta. Por lo que, habitualmente, desde este tipo de tumores pueden ser obtenidas biopsias bajo anestesia local, de forma ambulatoria. Estas recomendaciones se basan en opiniones de expertos, siendo respaldada por guías de práctica clínica como la del Reino Unido⁴.

Ahora bien, en el caso que el paciente no tolere el procedimiento, esta biopsia incisional puede ser realizada bajo anestesia general.

Biopsia excisional

Una frase conocida en nuestra especialidad es que “la amigdalectomía es la biopsia mínima de lesiones en amígdala”. Esto ha sido desmentido en las últimas décadas, debido a que la gran mayoría de los tumores pueden ser biopsiados de forma incisional, de forma adecuada, sin tener la necesidad de realizar una amigdalectomía. Sin embargo, en pacientes con sospecha de linfoma o en pacientes con sospecha de metástasis cervical de primario desconocido, la amigdalectomía sigue teniendo cabida.

En pacientes con metástasis cervical de primario desconocido (MCPD) la amigdalectomía sigue teniendo cabida, específicamente, en aquellos pacientes que presenten un estudio endoscópico e imagenológico negativo. Este cáncer se define como aquel CE metastizado hacia linfonodos cervicales sin evidencia de tumor primario al examen físico, lo que puede deberse a su localización, tamaño pequeño y/o regresión potencial del primario, los cuales dan cuenta del 2-5% de los pacientes con CE de cabeza y cuello⁵.

Algunos autores recomiendan realizar amigdalectomía palatina ipsilateral al lado del cuello comprometido, mientras que si el compromiso es bilateral se recomienda amigdalectomía palatina ipsilateral al lado con mayor carga linfonodal en un comienzo, y si esta es negativa, se recomienda realizar la contralateral⁶.

Por otro lado, la guía de práctica clínica de la *American Society of Clinical Oncology*, recomienda que en este tipo de pacientes, cuando presenta un compromiso unilateral, realizar amigdalectomía palatina ipsilateral y en caso que esta sea negativa, realizar una amigdalectomía lingual ipsilateral, dejando la amigdalectomía bilateral a discreción del cirujano. Ahora bien, si el compromiso es bilateral, se recomienda realizar amigdalectomía lingual unilateral en el lado de mayor carga linfonodal comprometida o bilateral, según criterio del cirujano, recomendando en cambio realizar amigdalectomía palatina bilateral simultánea por el riesgo de estenosis faríngea⁷. Esto debido a la baja tasa de metástasis regional bilateral desde amígdalas palatinas, a diferencia del subsitio base de lengua.

TORS en MCPD

Una de las modalidades diagnósticas que ha ganado terreno en el caso de pacientes con MCPD es la cirugía transoral robótica (TORS, por sus siglas en inglés) diagnóstica. Ésta, presenta la ventaja de presentar una excelente exposición de la faringe, reportándose una capacidad de detección, en algunos estudios, entre un 78 a 80% de tumores orofaríngeos ocultos mediante amigdalectomía lingual u orofaringectomía ipsilateral, especialmente en pacientes con tumores relacionados con VPH^{6,8}.

Por otro lado, presenta la ventaja de poder realizar tanto el diagnóstico como la resección del tumor primario en el mismo tiempo. Esto se ha visto en algunos estudios prospectivos pequeños, como el publicado por Durmus y colaboradores, donde de los 22 pacientes con MCPD se alcanzó una resección quirúrgica completa en 17 pacientes (77,3%), no evaluando resultados oncológicos tales como supervivencia específica de enfermedad ni recurrencias asociadas⁹.

Hallazgos histopatológicos del CEOF relacionado con VPH

Una de las características más importantes de analizar en relación con el grupo de CEOF relacionados con VPH son las histopatológicas. Este tipo de carcinoma proviene, principalmente, a nivel de las criptas tonsilares, específicamente, desde el epitelio reticular. Por lo que presentan características

morfológicas de dicho epitelio, siendo habitualmente tipo no queratinizantes, presentando diferentes patrones histológicos, donde se encuentran el tipo clásico basaloide, papilar, linfoepitelial, adenocarcinoma de base de lengua, adenoescamoso, células pequeñas, neuroendocrino con células gigantes y tipo sarcomatoide, estos 3 últimos con peor pronóstico¹⁰.

El tipo histológico basaloide clásico se caracteriza por ser no queratinizante, además de presentar células con una relación núcleo/citoplasma elevado, linfocitos entre sus células, además de citoplasma sincicial, dispuestas en láminas o cintas, con frecuente necrosis central. Es importante señalar que la distinción de carcinoma *in situ* versus invasor es difícil a nivel histopatológico en este tipo de carcinomas por ser derivados del epitelio reticular, el cual, en condiciones normales, presenta disrupción de la membrana basal. Además, este tipo de epitelio no presenta reacción dermoplástica frente a la invasión por parte de las células tumorales, por lo que actualmente se ha optado por no utilizar el concepto *in situ* en este tipo de patología¹⁰. Por otro lado, con respecto a las metástasis linfonodales, éstas se caracterizan por presentar necrosis central junto con degeneración quística, manteniendo características del tumor primario lo que ayuda a su distinción¹⁰.

Determinación histopatológica del virus papiloma humano

Para el diagnóstico histológico de la relación oncológica entre CEOF y VPH, se disponen de pruebas que varían en sensibilidad y especificidad. Por un lado, existen pruebas inmunohistoquímicas (IHQ), donde se encuentra el marcador p16, el cual representa un marcador indirecto de integración del VPH al ADN celular. La proteína p16 se acumula en células tumorales del CE relacionado con VPH secundario a la acción de la oncoproteína E7 viral que inhibe a la proteína de retinoblastoma, la cual, normalmente, inhibe a la proteína p16, por lo que provoca la acumulación de ésta. Este marcador inmunohistoquímico tiene una sensibilidad de hasta un 100%, pero con una especificidad cercana a 80 – 85% para células tumorales relacionadas con VPH. El marcador p16 es considerado positivo en CE de cabeza y cuello cuando el 70% o más de las células tumorales muestran una tinción moderada a fuerte tanto a nivel nuclear como citoplasmático^{10,11}.

Por otro lado, hay técnicas de biología molecular donde se encuentran la hibridación *in situ* (ISH por sus siglas en inglés) para ADN y ARN viral y la PCR para ADN viral. Con respecto a la ISH para

ADN viral es una técnica, altamente, específica debido a que detecta, directamente, la integración del ADN viral al ADN celular, sin embargo, presenta una sensibilidad más baja, ya que no detecta todos los VPH oncogénicos, dependiendo de las sondas virales utilizadas. En relación con la PCR de ADN viral, es una técnica altamente sensible, pero con una especificidad incierta para integración viral, debido a que detecta tanto el ADN integrado como el ADN “pasajero” a nivel citoplasmático no tumorigénico^{10,11}.

Por los datos anteriormente comentados, el Colegio Americano de Anatomopatólogos publicó en el 2017 una guía clínica para el análisis del VPH en los CECC. Dentro de sus recomendaciones destaca el realizar la detección de VPH, a través de IHQ con el marcador p16, en todas las biopsias que sean compatibles con carcinoma escamoso de orofarínge, independiente de su subtipo histológico o también en el caso de una muestra de tejido obtenida desde una metástasis cervical de primario desconocido localizada en el grupo ganglionar cervical II - III. No se recomienda realizar la detección del VPH en biopsias desde otra parte de cabeza y cuello que no sea orofarínge o de otro grupo ganglionar cervical que no sea grupo II o III, tampoco se recomienda realizar este análisis en un carcinoma no escamoso de orofarínge¹¹.

Por otro lado, se recomienda complementar con estudios específicos para VPH, especialmente ISH, frente a una biopsia con IHQ positiva para p16 cuando: esta muestra es obtenida de un tumor multisitio que compromete orofarínge; cuando la muestra de una MCPD no tiene localización cierta, se origine en grupos diferentes al grupo II o III, provenga del grupo II o III pero presente morfología queratinizante; y también cuando la IHQ da como resultado entre un 50 a 70% de tinción nuclear o citoplasmática con el marcador p16 para células tumorales¹¹.

Biopsia ganglionar

Punción con aguja fina y biopsia core

En el caso del CEOF, la principal indicación de punción con aguja fina (PAF) y de biopsia core es en el caso de pacientes con MCPD⁶.

En pacientes con MCPD, ambas modalidades presentan una gran utilidad, siendo la herramienta de primera línea, mínimamente invasiva y costo efectiva. Esta debiese ser realizada bajo visión eco-gráfica con el fin de asegurar una toma adecuada de la muestra y reducir las muestras no diagnósticas.

Esto es especialmente relevante en el CEOF relacionado con VPH, el cual presenta, frecuentemente, adenopatías metastásicas quísticas, por lo que la biopsia debe ser guiada hacia la periferia con el fin de asegurar una adecuada celularidad⁶.

En cuanto a la capacidad diagnóstica de la punción con aguja fina, un meta-análisis realizado por Tandon y colaboradores, demostró que para linfonodos cervicales, la PAF presenta una sensibilidad de un 94,2% y una especificidad de 96,9%; presentando, independiente del sitio anatómico evaluado, una tasa de falsos positivos de 3,5% y de falsos negativos de 10,3%¹².

En relación con la biopsia *core*, éste tiene la ventaja de obtener tejido que permite realizar estudios de inmunohistoquímica de forma más completa, presentando una mayor exactitud diagnóstica comparado con la PAF(13). Algunos estudios muestran sensibilidad y especificidad de la biopsia *core* de un 92% y 100%, respectivamente¹⁴.

Biopsia líquida

Este punto ha estado en constante desarrollo en el último tiempo, especialmente debido a la influencia del desarrollo del tamizaje y seguimiento del carcinoma nasofaríngeo, el cual, similar que el CEOF, presenta una etiología viral en la mayoría de los pacientes, en este caso por el Virus Epstein Barr (VEB)^{15,16}.

En este sentido, se ha intentado emular este tipo de abordaje en el CEOF debido a su relación con el VPH, el cual presenta un genoma con componentes únicos que lo hacen distinguible del resto¹⁷. Recordemos que el genoma del VPH corresponde a una molécula circular de ADN de doble hebra y su presencia en el núcleo de la célula tumoral corresponde a una alteración genética *per sé*. Se conoce que este genoma se encuentra presente como moléculas libres episomales en lesiones benignas e intraepiteliales, mientras que la integración del ADN viral al hospedero corresponde a un *hallmark* de la mayoría de los cánceres invasivos¹⁷.

En cuanto a su valor diagnóstico, se ha intentado utilizar el ADN circulante tumoral (ctDNA, por sus siglas en inglés) como marcador tumoral, esto debido a que el ADN del VPH presente en la células tumorales difunde hacia el torrente sanguíneo pudiendo ser identificado, referido como ctHPV DNA¹⁸.

Se ha visto que al momento del diagnóstico de pacientes con CE de cabeza y cuello (CECC) relacionados con VPH, las tasas de positividad para

ctHPV DNA varían entre 60,5 a 95,9%. Interesantemente, se ha visto que tumores pequeños pueden estar asociados con altos niveles de ctHPV DNA en comparación con los menores niveles encontrados en casos más avanzados, lo que se puede relacionar con múltiples factores, desde la carga viral y la integración del ADN viral, hasta el comportamiento tumoral y el microambiente en el cual se inserta^{17,19,20}.

Por el hecho de poder ser detectado de forma subclínica y estar altamente correlacionado al momento del diagnóstico inicial, se plantea como posible marcador tumoral para tamizaje de pacientes con CECC relacionados VPH. Sin embargo, el principal rol investigado es en seguimiento, como marcador de recurrencias luego de tratamiento, lo que escapa del objetivo de este escrito²⁰.

Actualmente, existen escasos estudios caso-controles que han demostrado su posible utilidad diagnóstica. Como en el estudio realizado por Siravegna y colaboradores, donde se observó que la detección de ctHPV DNA para VPH 16, 18, 33, 35 y 45, utilizando la técnica *droplet*-digital PCR, presentaba una sensibilidad y especificidad para detectar CECC relacionados con VPH de 98,4% y 98,6%, respectivamente²¹.

Una de las ventajas de este tipo de estudio, es la precocidad en la detección de pacientes con posible CECC relacionado con VPH. Un estudio caso control, realizado por Rettig y colaboradores, donde analizaron muestras de sangre obtenidas desde 12 pacientes con CECC relacionados con VPH con más de 6 meses antes del diagnóstico de CECC, comparados con controles sin diagnóstico de CECC, observó que de los pacientes con CECC relacionados con VPH (10 pacientes), 30% presentaban niveles plasmáticos detectables de ctHPV DNA 16, lo que aumentaba a un 43% (3 de 7 pacientes) si solo se incorporaba aquellos de orofaringe. Estos niveles plasmáticos detectables fueron determinados a los 9, 34 y 43 meses antes del diagnóstico de cáncer. En este estudio, la especificidad fue de un 100% para esta técnica²².

A pesar de los estudios anteriores, aún falta mayor evidencia para aceptar a esta modalidad diagnóstica como estándar de cuidado.

Conclusiones

El carcinoma escamoso de orofaringe es una enfermedad en constante estudio, especialmente, debido a su asociación con VPH. Actualmente, el método diagnóstico de elección es la biopsia incisional, la cual se puede realizar de forma ambulatoria.

Mientras que la biopsia excisional, se restringe en casos de sospecha de linfoma o MCPD.

Este es un tema que está en continua evolución, donde el desarrollo de la biopsia líquida mediante la detección del ctHPV DNA puede cambiar el paradigma de nuestro manejo actual.

Conflictos de interés: Felipe Carvajal: Proyecto financiado por ANID + FONDEF/XVIII Concurso Nacional de Proyectos de Investigación y Desarrollo en Salud, FONIS SAI21|0003.

Sebastián Castro y Felipe Cardemil: Sin conflictos de interés.

Bibliografía

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71:209-49.
2. Perdomo S, Martin Roa G, Brennan P, Forman D, Sierra MS. Head and neck cancer burden and preventive measures in Central and South America. *Cancer Epidemiol*. 2016;44:S43-52.
3. 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* 2011;29:4294-301.
4. Mehanna H, Evans M, Beasley M, Chatterjee S, Dikkes M, Homer J, et al. Oropharyngeal cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. *J Laryngol Otol* [Internet]. 2016;130(S2):S90-6. Available from: <https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-laryngology-and-otology/article/oropharyngeal-cancer-united-kingdom-national-multidisciplinary-guidelines/3F870614780722B7DB8285503E72CFAC>. [cited 2023 Feb 4].
5. Kalavacherla S, Sanghvi P, Lin GY, Guo T. Updates in the management of unknown primary of the head and neck. *Fronteras en Oncología* 2022;12:991838. doi: 10.3389/fonc.2022.991838.
6. Ye W, Arnaud EH, Langerman A, Mannion K, Topf MC. Diagnostic approaches to carcinoma of unknown primary of the head and neck. *Eur J Cancer Care (Engl)* [Internet]. 2021;30(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33932056/> [cited 2023 Feb 4].
7. Maghami E, Ismaila N, Alvarez A, Chernock R, Duvvuri U, Geiger J, et al. Diagnosis and Management of Squamous Cell Carcinoma of Unknown Primary in the Head and Neck: ASCO Guideline. *J Clin Oncol* [Internet]. 2020;38(22):2570-96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32324430/> [cited 2023 Feb 5].
8. Hatten KM, O'Malley BW, Bur AM, Patel MR, Rassekh CH, Newman JG, et al. Transoral Robotic Surgery-Assisted Endoscopy With Primary Site Detection and Treatment in Occult Mucosal Primaries. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2017;143(3):267-73. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27930761/> [cited 2023 Feb 5].
9. Durmus K, Rangarajan S v., Old MO, Agrawal A, Teknos TN, Ozer E. Transoral robotic approach to carcinoma of unknown primary. *Head Neck* [Internet]. 2014;36(6):848-52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23720223/> [cited 2023 Feb 5].
10. Stevens TM, Bishop JA. HPV-related carcinomas of the head and neck: morphologic features, variants, and practical considerations for the surgical pathologist. *Virchows Arch* [Internet]. 2017;471(2):295-307. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28417200/> [cited 2023 Apr 20].
11. Lewis 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* [Internet]. 2018;142(5):559-97. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29251996/> [cited 2023 Feb 5].
12. 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* [Internet]. 2008;30(9):1246-52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18528906/> [cited 2023 Feb 5].
13. Novoa E, Gürtler N, Arnoux A, Kraft M. Role of ultrasound-guided core-needle biopsy in the assessment of head and neck lesions: a meta-analysis and systematic review of the literature. *Head Neck* [Internet]. 2012;34(10):1497-503. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22127851/> [cited 2023 Apr 21].
14. Ferreira VHC, Sassi LM, Zaninotti RTS, Ramos GHA, Jung JE, Schussel JL. Core needle biopsy in the diagnosis of head and neck lesions: a retrospective study of 3 years. *Eur Arch Otorhinolaryngol* [Internet]. 2016;273(12):4469-72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27295173/> [cited 2023 Apr 21].
15. Lam WKJ, Jiang P, Chan KCA, Cheng SH, Zhang H, Peng W, et al. Sequencing-based counting and size profiling of plasma Epstein-Barr virus DNA enhance population screening of nasopharyngeal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2018;115(22):E5115-24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29760067/> [cited 2023 Feb 6].
16. Chan KCA, Woo JKS, King A, Zee BCY, Lam WKJ, Chan SL, et al. Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 2017;377(6):513-22. Available from: <https://www.nejm.org/doi/full/10.1056/nejmoa1701717> [cited 2023 Feb 6].
17. Sastre-Garau X, Harlé A, Lechien JR, Tommasino M, Chiesa-Estomba CM. Pathology of HPV-Associated Head and Neck Carcinomas: Recent Data and Perspectives for the Development of Specific Tumor Markers. 2020;10:1. Available from: www.frontiersin.org
18. Jeannot E, Becette V, Campitelli M, Calméjane MA, Lappartient E, Ruff E, et al. Circulating human papillomavirus

- DNA detected using droplet digital PCR in the serum of patients diagnosed with early stage human papillomavirus-associated invasive carcinoma. *J Pathol Clin Res* [Internet]. 2016;2(4):201-9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27917295/> [cited 2023 Feb 5].
19. Damerla RR, Lee NY, You D, Soni R, Shah R, Reyngold M, et al. Detection of Early Human Papillomavirus-Associated Cancers by Liquid Biopsy. *JCO Precis Oncol* [Internet]. 2019;3(3):1-17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31485558/> [cited 2023 Feb 5].
 20. Chera BS, Kumar S, Shen C, Amdur R, Dagan R, Green R, et al. Plasma Circulating Tumor HPV DNA for the Surveillance of Cancer Recurrence in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2020;38(10):1050-8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32017652/> [cited 2023 Mar 3].
 21. Siravegna G, O'Boyle CJ, Varmeh S, Queenan N, Michel A, Stein J, et al. Cell-Free HPV DNA Provides an Accurate and Rapid Diagnosis of HPV-Associated Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2022;28(4):719-27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34857594/> [cited 2023 Apr 21].
 22. Rettig EM, Faden DL, Sandhu S, Wong K, Faquin WC, Warinner C, et al. Detection of circulating tumor human papillomavirus DNA before diagnosis of HPV-positive head and neck cancer. *Int J Cancer* [Internet]. 2022;151(7):1081-5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35262203/> [cited 2023 Apr 21].