



CIRUGÍA y CIRUJANOS

Órgano de difusión científica de la Academia Mexicana de Cirugía
Fundada en 1933

www.amc.org.mx www.elsevier.es/circir



ARTÍCULO ORIGINAL

Prevalencia de infección por virus del papiloma humano en carcinoma espinocelular de cavidad oral, orofaringe y laringe



Vicente José Villagómez-Ortíz^{a,*}, Diana Estela Paz-Delgadillo^a,
Iván Marino-Martínez^b, Luis Ángel Ceseñas-Falcón^c,
Anabel Sandoval-de la Fuente^a y Alfonso Reyes-Escobedo^a

^a Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

^b Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

^c Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, Nuevo León, México

Recibido el 7 de mayo de 2015; aceptado el 11 de enero de 2016

Disponible en Internet el 28 de marzo de 2016

PALABRAS CLAVE

Virus del papiloma humano;
Carcinoma espinocelular;
Cabeza y cuello;
Laringe;
Cavidad oral

Resumen

Antecedentes: El carcinoma de cabeza y cuello comprende un grupo de neoplasias que comparten un origen anatómico similar. La mayoría se originan de la mucosa del tracto aerodigestivo y más del 90% corresponden al carcinoma espinocelular. En los últimos 15 años se observó un incremento en la incidencia de carcinoma espinocelular inducido por el virus del papiloma humano (VPH) en jóvenes, principalmente los serotipos 16 y 18, los cuales son los más estudiados en cáncer de cavidad oral y orofaringe, y los serotipos 6 y 11 en cáncer de laringe. Existen reportes en la literatura sobre el VPH como principal causa de carcinoma espinocelular, principalmente de orofaringe.

Objetivo: Determinar la prevalencia de infección por VPH de alto riesgo en pacientes con diagnóstico de carcinoma espinocelular de cavidad oral, orofaringe y laringe.

Material y métodos: Estudio observacional, transversal, descriptivo, no ciego. Se determinó la prevalencia de infección por VPH por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en muestras de ADN de tejido tumoral en pacientes con carcinoma espinocelular de cavidad oral, orofaringe y laringe. Se realizó tipificación de serotipos de alto riesgo.

* Autor para correspondencia. Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello. Universidad Autónoma de Nuevo León. Hospital Universitario, Av. Madero y Gonzalitos s/n, Colonia Mitras Centro, C.P. 64460 Monterrey, Nuevo León, México. Tel.: +52 (81) 8333 4299.

Correo electrónico: centrodevoz@yahoo.com.mx (V.J. Villagómez-Ortíz).

KEYWORDS

Human
papillomavirus;
Squamous cell
carcinoma;
Head and neck;
Laryngeal;
Oral cavity

Resultados: Se incluyó en el estudio un total de 45 pacientes. La asociación entre el carcinoma de células escamosas de laringe con VPH se ailo en 2 pacientes, lo cual represento una prevalencia global del 4.4% en nuestra población y del 10% para los tumores de laringe.

Conclusiones: Existe una baja prevalencia de carcinoma espinocelular de la cavidad oral, orofaringe y laringe, asociado a infección por VPH en nuestra población. Estudios prospectivos en población más joven con cáncer de cabeza y cuello podrían aportar mayor información sobre la influencia del VPH en dicha patología.

© 2016 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Publicado por Masson Doyma México S.A. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Prevalence of human papillomavirus infection in squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx and larynx

Abstract

Background: Cancer of the head and neck comprises a group of neoplasms that share a similar anatomical origin. Most originate from the epithelium of the aerodigestive tract and 90% correspond to squamous cell carcinoma. In the last 15 years, an increase in the incidence of squamous cell carcinoma induced by human papillomavirus (HPV) has been seen, mainly types 16 and 18, which are the most frequent found in cancers of the oral cavity and oropharynx, and types 6 and 11 in laryngeal cancer. There are reports in the literature that show HPV as the leading cause of oropharyngeal squamous cell carcinoma.

Objective: Determine the prevalence of infection with high-risk HPV in patients diagnosed with squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx and larynx.

Material and methods: An observational, cross-sectional, descriptive, unblinded study was performed. Prevalence of HPV infection was determined by polymerase chain reaction (PCR) in DNA samples from tumour tissue of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx and larynx. Typing was subsequently performed in HPV positive samples in order to detect types 18, 16, 11 and 6, using custom primers.

Results: A total of 45 patients were included. The association between laryngeal squamous cell carcinoma and HPV was established in two patients, which represented an overall prevalence of 4.4% in our population, and 10% for laryngeal tumours.

Conclusions: There is a low prevalence of HPV infection in squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx and larynx, in our population. Prospective studies on younger patients could provide more information.

© 2016 Academia Mexicana de Cirugía A.C. Published by Masson Doyma México S.A. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Antecedentes

El carcinoma de cabeza y cuello comprende un grupo de neoplasias que comparten un origen anatómico similar; la mayoría se originan de la mucosa que recubre el epitelio del tracto aerodigestivo y más del 90% corresponden al carcinoma espinocelular. Ocupan el sexto lugar mundial entre las neoplasias de todas las localizaciones, y el sitio afectado con más frecuencia es la cavidad oral¹.

Se estima que aproximadamente 400,000 nuevos casos al año son diagnosticados en todo el mundo, con mayor prevalencia en el hombre; los sitios de origen más comunes son la cavidad oral y la orofaringe. En la cavidad oral la región más afectada es la lengua, seguida de la encía y el piso de boca; en la orofaringe y la región amigdalina².

En México, el 5% de todas las neoplasias corresponden al carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, que por lo general se identifica en etapas avanzadas, sobre todo en la lengua³.

Diversos mecanismos han sido descritos en la génesis de los tumores originados en vías aerodigestivas superiores, entre los que destacan los efectos carcinogénicos del alcohol y el tabaco, que son reconocidos como los principales factores de riesgo y juegan un papel importante en su etiopatogenia debido a su potencial para inducir mutaciones en el gen supresor tumoral p53⁴.

Sin embargo, ahora se reconoce el rol del virus del papiloma humano como factor independiente en el desarrollo de estas neoplasias. En los últimos 15 años se ha observado un incremento en la incidencia de carcinoma espinocelular inducido por virus del papiloma humano (VPH), incrementando la frecuencia en pacientes jóvenes y en no fumadores o bebedores, asociado sobre todo a serotipos de alto riesgo como el subtipo viral 16 y apoyado por reportes en la literatura en los que se vincula al VPH como la principal causa de carcinoma espinocelular de orofaringe^{5,6}.

Se conocen más de 180 subtipos virales, de los cuales más de 40 subtipos del VPH son transmitidos sexualmente e infectan el tracto anogenital y de esta forma son transmitidos a la cavidad oral⁷.

Los VPH han sido clasificados como de alto riesgo, riesgo intermedio y bajo riesgo, dependiendo de su asociación con neoplasias malignas. Los serotipos 16 y 18 son considerados de alto riesgo y se han relacionado con cáncer de cavidad oral y orofaringe, mientras que los serotipos 6 y 11 son considerados de bajo riesgo y se han relacionado con el cáncer de laringe⁸.

El mecanismo por el cual el virus induce carcinoma epidermoide de cabeza y cuello no ha sido del todo aclarado y es controvertido. El potencial oncogénico para insertar fragmentos específicos de ADN (E6 y E7) en el genoma del huésped tiene como resultado la supresión de factores supresores de tumores p53 o Rb y la capacidad de inducir lesiones displásicas y neoplasias malignas⁹.

La mayoría de los individuos inmunocompetentes son capaces de eliminar la infección sin manifestaciones clínicas, y solo el 10% desarrollarán lesiones. La integración del ADN del virus en el genoma del huésped es un predictor de la progresión de una infección a la formación de una neoplasia¹⁰.

A pesar de incrementar el riesgo de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, se ha relacionado a un mejor pronóstico en los pacientes en quienes el ADN viral es detectado y, por lo tanto, tienen mejor control y supervivencia. Un estudio realizado en Estados Unidos en 2010 demostró que el carcinoma espinocelular VPH positivo presentó una reducción del 58% de riesgo de muerte, mientras que la edad, el índice tabáquico y la infiltración linfática continúan siendo factores determinantes en la sobrevida¹¹.

El objetivo del presente artículo es determinar la prevalencia de VPH de *alto riesgo* (16, 18) y de *bajo riesgo* (6, 11) en pacientes con carcinoma espinocelular de cavidad oral, orofaringe y laringe.

Material y métodos

Se efectuó un estudio observacional, transversal, descriptivo, no ciego que incluyó a todos los pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma espinocelular de cavidad oral, orofaringe y laringe que acudieron al Servicio de Otorrinolaringología y Cirugía de Cabeza y Cuello del Hospital Universitario José Eleuterio González entre el 1 de enero de 2011 y el 31 de diciembre de 2013, obteniendo un total de 45 pacientes.

Se incluyeron en el estudio pacientes de ambos géneros con diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello primario.

Fueron excluidos los pacientes con carcinoma de cavidad oral, orofaringe y laringe con otro tipo histológico diferente al espinocelular, los pacientes menores de 18 años y los pacientes que fueron previamente irradiados o que habían recibido quimioterapia.

Se realizó una historia clínica completa en cada paciente para buscar factores de riesgo relacionados con el desarrollo de carcinoma espinocelular, como alcoholismo, tabaquismo, enfermedad periodontal, presencia de papilomatosis laríngea y antecedentes familiares de carcinoma epidermoide de

cabeza y cuello. Se realizó una exploración otorrinolaringológica completa, incluyendo exploración instrumentada, con endoscopio flexible mediante fibra óptica Karl Storz RP1® y sistema de digitalización Endodigi®. Se realizó la búsqueda de material genético de VPH por la técnica de reacción en cadena de polimerasa de punto final.

La extracción de ADN de tejido tumoral fresco se realizó en 9 pacientes, y en el resto se obtuvo de tejido almacenado en bloques de parafina. Se obtuvieron bloques de parafina de 10 µm de grosor, se recolectaron en tubos de 1.5 ml, se deparafinizaron y posteriormente fueron deshidratados. Se realizó extracción de ADN por el método de proteinasa K/fenol. Se determinó la concentración de ADN por espectrofotometría en el NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE) y una cantidad se corrió por electroforesis en gel de agarosa al 1% para evaluar visualmente su calidad. Para la detección del VPH se utilizó la técnica de PCR punto final, utilizando los iniciadores generales MY09/MY11 y GP5/GP6 para la detección de la región L1 y Cpl/CpII para detección del gen E1. Se utilizó un termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Hamburg, Alemania) para realizar las PCR.

A las muestras positivas para el virus del papiloma humano se les rastreó la presencia de los subtipos virales 6, 11, 16 y 18 mediante iniciadores específicos de VPH.

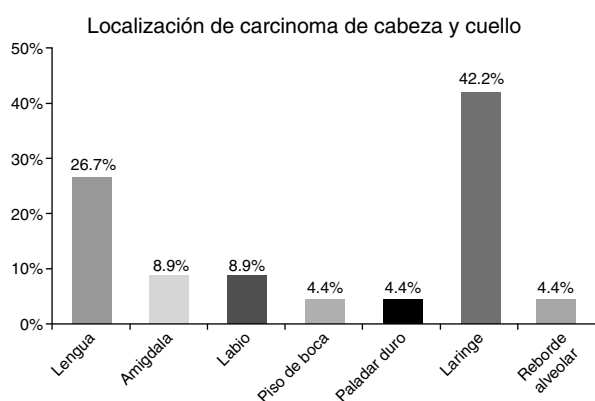
Muestras de ADN y análisis por reacción en cadena de la polimerasa

El ADN fue extraído de 8 muestras frescas tumorales de las biopsias y 36 de biopsias tumorales embebidas en parafina; ambas muestras fueron extraídas usando el protocolo de K/fenol. Sin embargo, los bloques de parafina fueron cortados en rebanadas de 10 µm de grosor y desparafinizadas con xilol previo a la digestión de proteinasa K. La concentración de ADN fue determinada por espectrofotometría usando NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, DE), corriendo a su vez una pequeña cantidad en gel de agarosa al 1% para electroforesis y valorando su calidad. Para la detección del VPH se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final con iniciadores generales MY09/MY11 (MY09: 5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3', MY11: 5'-GCMCAGGGWCAT-AAAATGG-3') y GP5/GP6 (GP5 5'-TTTGTACTGTGGTAGA-TACTAC-3'; GP6 5'-GTAGTATCTACCACAGTAACAAA-3') para detectar el gen viral L1 y Cpl/CpII (Cpl: TTATCAWATGCCAYTGTTACCAT-3'; CpII: 5'-G ATGTTAATWSAGCCWCCAAA-ATT-3') y los iniciadores para la detección del gen E1. La PCR se realizó utilizando termociclador de gradiente Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania) y GoTaq-GreenMaster Mix (PROMEGA, EE. UU.), según los protocolos recomendados por la compañía manufacturera.

Una vez identificadas las muestras positivas para el VPH por cualquiera de los iniciadores generales (MY, GP y CP), la presencia de los subtipos virales 6, 11, 16 y 18 se determinó por PCR empleando iniciadores específicos diseñados para identificar un fragmento dentro del genoma viral de la región larga de control específico para dichos subtipos (VPH-6 5'-TATTCGTACCGGTGTTAAGCGCC-3'/5'-TTGGCAGGGCAATGTGTACCTG-3', VPH-11 5'-GCTGTGTCT-AAGCCCTCTACAG-3'/5'-GTACCTTGGCACACAACATAT GG-3',

Tabla 1 Características generales de la población en estudio

Características	Pacientes (n = 45)
Edad, años	58 (39-92)
Género, n (%)	
Masculino	32 (71)
Femenino	13 (29)
Factores de riesgo, n (%)	
Alcoholismo	16 (36)
Tabaquismo	22 (49)
Enfermedad periodontal	34 (76)
VPH+, n (%)	2 (4.4)

**Figura 1** Distribución de la localización primaria de carcinoma espinocelular de cabeza y cuello.

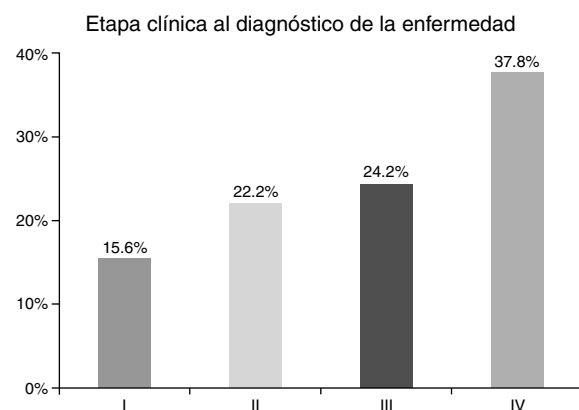
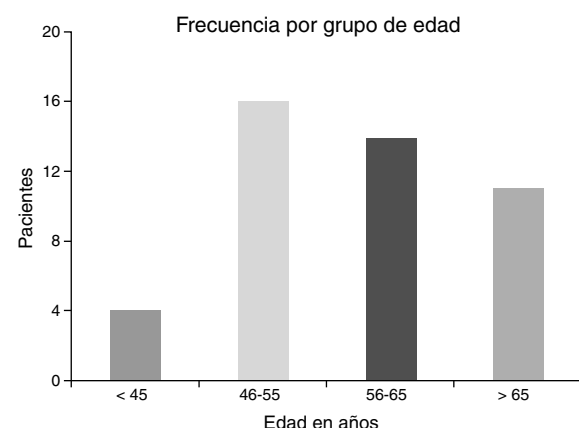
VPH-16 5'-ACCTCATCTACCTCTACAAGTGC-3'/5'-GGCAAGCA-GTGCAGGTC AGG-3' y VPH-18 5'-AACCTGCCAAGCGTGTG-CGTG -3'/5'-TAAGCCAAAGGCAACCGAAATCG-3').

Análisis estadístico

Para analizar las características de la muestra se empleó la estadística descriptiva utilizando las medianas y rangos para variables continuas y el porcentaje para las variables categóricas, además de medias y desviación estándar según la variable descrita. Se utilizó el programa IBM SPSS Statics versión 20.0.

Resultados

Se analizaron un total de 45 pacientes (32 hombres y 13 mujeres) con una mediana de edad de 58 años. El 49% de los pacientes presentaban antecedente de tabaquismo; el 36%, antecedente de alcoholismo, y la enfermedad periodontal se encontró en el 76% de los pacientes. El resto de las características demográficas de los pacientes se encuentra en la [tabla 1](#). Los sitios de localización encontrados fueron: laringe en 19 pacientes, representando el 42.2%; lengua en 12 pacientes; amígdala y labio con 4 cada uno; piso de boca, paladar duro y reborde alveolar en 2 pacientes ([fig. 1](#)). La distribución por etapa clínica de la enfermedad al momento del diagnóstico fue: 17 pacientes en etapa clínica IV, 11 pacientes en etapa III, 10 pacientes en etapa II y 7 en etapa

**Figura 2** Distribución por etapas clínicas de la enfermedad al diagnóstico.**Figura 3** Distribución por grupo de edad al diagnóstico de la enfermedad.

I ([fig. 2](#)). La infección por VPH se detectó en 2 pacientes (4.4%), ambos diagnosticados con cáncer de laringe. El subtipo viral detectado en ambos pacientes fue el tipo 11; en la [figura 3](#) se muestra la distribución por grupo de edad al diagnóstico de la enfermedad.

Discusión

La prevalencia encontrada de cáncer de cabeza y cuello según su localización, descrita por Parkin et al.¹ en Globocan 2000, resalta la cavidad oral como el sitio más comúnmente afectado (50%), concordando con nuestros resultados (57.8%). El cáncer de laringe se detectó en el 42.2% de nuestra población, a diferencia del 32% reportado por este mismo estudio.

En la mayoría de nuestros pacientes (62.2%) se detectó en una etapa clínica avanzada (etapa III y IV); esto se refleja en las condiciones de nuestra población, caracterizada por un nivel socioeconómico bajo y con difícil acceso a centros hospitalarios de alta especialidad, lo que permite el avance de la enfermedad hasta etapas avanzadas.

El tabaquismo es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de carcinoma epidermoide de cabeza y cuello. El 90% de los cánceres de la cavidad oral en hombres y el 60% en mujeres se atribuyen al consumo de tabaco¹². El hábito de colocarse tabaco en la mucosa oral (sublingual o en el

carrillo) aumenta el riesgo de 4 a 6 veces más de cáncer de la cavidad oral en labios, lengua y mucosa de carrillo. Este hábito es infrecuente en México pero popular en algunas regiones de Estados Unidos y Europa¹³; en nuestra población no encontramos pacientes con dicho hábito.

El consumo de alcohol se asocia también con el incremento en el riesgo de padecer carcinoma epidermoide de cabeza y cuello, siendo el segundo agresor en importancia después del tabaco. El riesgo de cáncer en bebedores es 6 veces mayor que en no bebedores, y el riesgo de muerte por cáncer de orofaringe es 4 veces mayor en los bebedores; por lo tanto, hay una relación estrecha con el carcinoma espinocelular originado en la cavidad oral, orofaringe, hipofaringe y supraglotis¹⁴.

La intoxicación alcohol-tabaco es sinérgica en la génesis del carcinoma epidermoide, disparando el riesgo relativo a 16 veces con su combinación¹⁵.

Observamos en nuestra población una prevalencia del 35% en bebedores y del 51% en fumadores. Existe también una prevalencia de cáncer de acuerdo al género masculino del 71%, que concuerda con lo descrito en la literatura. Sabemos que hay un incremento en la incidencia de cáncer de cabeza y cuello en la mujer debido al aumento en el hábito tabáquico, que ha llevado la relación 6:1 en los años sesenta a 4:1 en la actualidad en relación al hombre^{16,17}. En nuestro trabajo la relación aproximada hombre:mujer fue de 3:1, con inclinación hacia el género masculino.

Al inicio de la década de los ochenta, poco después del reconocimiento del VPH como factor etiológico del cáncer cervicouterino, se reconoció la participación de este virus en el cáncer de cabeza y cuello¹⁸.

Sin embargo, a pesar de los esfuerzos para disminuir el índice de uso de tabaco, el desarrollo de cáncer en la orofaringe y en las amígdalas palatinas se ha disparado 3 veces, tanto en Estados Unidos como en Europa^{19,20}.

Un metaanálisis realizado en 2008 por Termine et al.²¹ estableció una prevalencia del VPH en cáncer de cabeza y cuello originados en la cavidad oral, la faringe o la laringe del 34.5%.

Los subtipos virales más frecuentes son el 16 y 18 en cabeza y cuello, teniendo la capacidad de inmortalizar a la célula infectada debido a sus oncogenes E6 y E7 y a los factores de supresión de RB y p53^{22,23}. Existe evidencia en la literatura de un mejor pronóstico en la sobrevida (33%), mayor en pacientes con carcinoma epidermoide con VPH(+) versus con los VPH(-)²⁴.

La infección por VPH se detectó en 2 pacientes (4.4%), ambos diagnosticados con cáncer de laringe. El subtipo viral detectado en ambos pacientes fue el tipo 11. Para el resto de los tumores no se estableció una asociación con VPH, lo cual difiere con lo reportado en la literatura. Los pacientes en los que se identificó VPH tenían el antecedente de papilomatosis laríngea con displasia severa que progresó a carcinoma epidermoide; estos pacientes fueron detectados en un estadio temprano (etapas clínicas I y II).

Los posibles motivos por los cuales no se aisló VPH en la mayoría de nuestra población pueden deberse a varios factores; primero, el virus es epigenético al inicio de la infección, y por consiguiente es posible detectarlo en el ADN celular mucho antes de inducir lesiones displásicas; una vez integrado al genoma del huésped en el que ha producido cambios en la morfología celular es más difícil su detección, como lo

reportan Koskinen et al.²⁵ en un estudio reportado en 2003. Otro punto a considerar es la mediana de edad de nuestros pacientes, que fue de 58 años, debido a que el VPH se ha aislado en general en población más joven^{5,6}.

Conclusión

La frecuencia por localización de los diferentes carcinomas epidermoides de cabeza y cuello fue similar a lo reportado en la literatura, predominando la cavidad oral como sitio afectado. Se encontró una alta incidencia de los factores de riesgo típicamente mencionados (tabaquismo, alcoholismo, enfermedad periodontal), siendo la enfermedad periodontal el más frecuentemente encontrado. El VPH solo fue aislado en el 4.4% de nuestros pacientes; sin embargo, la mediana de edad de la población estudiada era alta, y el VPH ha sido aislado en población más joven con diagnóstico de carcinoma de cabeza y cuello, por lo que es importante realizar estudios prospectivos en pacientes de menor edad para esclarecer mejor el papel de dicho virus en esta enfermedad.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que para esta investigación no se han realizado experimentos en seres humanos ni en animales.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores declaran que en este artículo no aparecen datos de pacientes.

Agradecimientos

Agradecemos al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León y al Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina y al Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González por su apoyo para la realización de esta investigación, y a todos los pacientes que aceptaron participar en este estudio.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Parkin DM, Bray FI, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 2001;94:153-6.
2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009;45:309-16.
3. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiología. Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México. México: Secretaría de Salud México D.F.; 2011.
4. Tribius S, Hoffmann M. Human papilloma virus infection in head and neck cancer. *Dtsch Arztebl Int*. 2013;110:184-90.

5. Tomik J, Składzień J, Modrzejewski M, Konior M. Analysis of patients under 45 years of age with cancer of the larynx. *Otolaryngol Pol.* 2005;59:665–9.
6. Kreimer AR, Alberg AJ, Viscidi R, Gillison ML. Gender differences in sexual biomarkers and behaviors associated with human papillomavirus-16, -18, and -33 seroprevalence. *Sex Transm Dis.* 2004;31:247–56.
7. Joseph AW, D'Souza J. Epidemiology of human papillomavirus-related head and neck cancer. *Otolaryngol Clin North Am.* 2012;45:739–64.
8. Mineta H, Ogino T, Amano HM, Ohkawa Y, Araki K, Takebayashi S, et al. Human papilloma virus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 1998;18:4765–8.
9. Pannone G, Santoro A, Papagerakis S, lo Muzio L, de Rosa G, Bufo P. The role of human papilloma virus in the pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma: An overview. *Infect Agent Cancer.* 2011;6:4.
10. Sanclemente G, Gill DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2002;16:231–40.
11. Fischer CA, Zlobec I, Green E, Probst S, Storck C, Lugli A, et al. Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer.* 2010;126:1256–62.
12. Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006. Bethesda, MD: U.S. National Institutes of Health; 2008. p. 9–55.
13. Wray AW, McGuirt F. Smokeless tobacco usage associated with oral carcinomaincidence, treatment, outcome. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1993;119:929–33.
14. Macfarlane GJ, Zheng T, Marshall JR, Boffetta P, Niu S, Brasure J, et al. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: A pooled analysis of three case-control studies. *European J Cancer Part B: Oral Oncol.* 1995;31:181–7.
15. Marandas P, Marandas N. Situation actuelle des cancers des vois aéro-digestives supérieures en France et données épidémiologiques. En: Marandas P, editor. *Cancers des vois aéro-digestives supérieures. Données actuelles.* Issy-les-Moulineaux: Masson.; 2004. p. 3–19.
16. Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M. Cancer Statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2002;52:23–47.
17. Schantz SP, Yu GP. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973-1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128:268–74.
18. Goon PKC, Stanley MA, Ebmeier J, Steinsträsser L, Upile T, Jerjes W, et al. HPV & head and neck cancer: A descriptive update. *Head Neck Oncol.* 2009;1:36.
19. Frisch M, Hjalgrim H, Bonnerup Jæger A, Biggar RJ. Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States. *Cancer Causes Control.* 2000;11:489–95.
20. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: Increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. *Cancer.* 2005;103:1843–9.
21. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, Russo A, Matranga D, lo Muzio L, et al. HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: A meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol.* 2008;19:1681–90.
22. Park NH, Min BM, Li S, Huang MZ, Doniger J. Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis.* 1991;12:1627–31.
23. Oda D, Bigler L, Lee P, Blanton R. HPV immortalization of human oral epithelial cells: A model for carcinogenesis. *Exp Cell Res.* 1996;226:1164–9.
24. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100:261–9.
25. Koskinen WJ, Chen RW, Leivo I, Mäkitie A, Bäck L, Kontio R, et al. Prevalence and physical status of human papillomavirus in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer.* 2003;107:401–6.