

Valor del VPH como indicador de pronóstico en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello

HPV value as prognostic indicator in patients with head and neck squamous cell carcinoma

Gallegos-Hernández José Francisco,¹ Flores-de la Torre Celia,² Hernández-Hernández Dulce María³

▷ RESUMEN

Introducción: El virus del papiloma humano tipo 16 (VPH-16) ha sido identificado como como factor pronóstico en pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CCYC). La presencia del virus se ha asociado a mejor supervivencia y control loco-regional. El objetivo del presente estudio es conocer si VPH tiene valor pronóstico en pacientes con CCYC.

Métodos: Evaluación retrospectiva de pacientes con CCYC, se analizó sobrevida, localización tumoral, estadio estado general (ECOG), tipo de tratamiento y presencia de VPH. Análisis descriptivo para sobrevida con Kaplan-Meier y regresión de Cox, con intervalo de confianza del 95%.

Resultados: Se incluyeron 179 pacientes 119 (66.5%) hombres; promedio de edad 64 años. Se localizaron en cavidad oral 34% y 33% en laringe. Factores asociados con sobrevida: ECOG (RR = 11.3; 2.6 a 48), estadio clínico (RR = 7.8; 1.7 a 34), edad mayor a 70 años (RR = 3.5, 1.4 a 8.5) y tratamiento no quirúrgico (RR = 2.3; 1.4 a 3.8). La mediana de sobrevida para pacientes con VPH16, fue 22 meses *vs.* 28 meses en los que tuvieron otros tipos virales. La infección por VPH no se asoció al pronóstico en ésta serie.

Palabres clave: Cáncer de cabeza y cuello, virus del papiloma humano (VPH), factores pronóstico, México.

▷ ABSTRACT

Background: The human papilloma virus type 16 (HPV-16) has been identified as a prognostic factor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN), the virus has been acknowledged as a prognostic factor. The goal of this paper is to know whether HPV is of prognosis value in patients with SCCHN.

Methods: Retrospective evaluation of patients with SCCHN; we analyzed survival, tumor location, stage, general condition (ECOG), kind of treatment and HPV association identified by PCR in tumor tissue. Descriptive analysis for survival with Kaplan-Meier and Cox regression, with 95% confidence interval.

Results: 179 patients were included, 119 (66.5%) men; 64 year-old average age. 34% located in the oral cavity and 33% in the larynx. Factors associated with survival: ECOG (RR = 11.3; 2.6-48), clinical stage (RR = 7.8; 1.7-34), age over 70 years old (RR = 3.5, 1.4-8.5) and non-surgical treatment (RR = 2.3; 1.4-3.8). The overlife media for patients with HPV16 was 22 months *vs.* 28 months in those with other kinds of virals. HPV infection was not associated to the prognosis in this series.

Key words: Head cancer, neck cancer, human papillomavirus (HPV), prognostic factors, Mexico.

1Departamento de Tumores de Cabeza y Cuello.

2Departamento de Oncología Médica.

3Departamento de Epidemiología.

Hospital de Oncología del CMN SXXI. IMSS. México, D. F.

Correspondencia: Dr. José Francisco Gallegos Hernández. Ave. Cuauhtémoc 330. Colonia Doctores. Teléfonos: (55)5627 6900, extensión 22778 y 04455 1068 6006. Correo electrónico: gal61@prodigy.net.mx

▷ INTRODUCCIÓN

El carcinoma epidermoide (CE) es la neoplasia maligna más frecuente originada en mucosas de cabeza y cuello; tradicionalmente se le ha asociado al consumo de alcohol y tabaco, así como a la presencia de placa dentobacteriana.^{1,2}

La infección por virus del papiloma humano (VPH) es reconocida ya como un factor de riesgo para CE; se estima que entre 30% y 60% de los pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello (CECYC) tienen infección por VPH principalmente de tipo 16 (muy alto riesgo) y 18 (alto riesgo);³ es una infección sexualmente transmisible y existe evidencia clínica con nivel 1, que ha demostrado que el número de parejas sexuales y el contacto oro-genital son factores de riesgo para contraer la infección.³⁻⁵

En el área de cabeza y cuello, el sitio que con mayor frecuencia presenta infección por VPH es la orofaringe, seguida por la cavidad oral y la laringe; en pacientes menores de 40 años de edad que no consumen alcohol ni tabaco, el VPH es el causante del CE.

Un hecho interesante y controvertido es que en pacientes con CECYC, la asociación de infección de VPH implica mejor pronóstico comparado con pacientes sin esta infección; la presencia de VPH-16 implica mayor tasa de respuesta a radioterapia, mejor control loco-regional y mayor supervivencia sin embargo éste hallazgo es debatible y otros autores han atribuido el buen pronóstico de los pacientes infectados por el virus, efectivamente a una mayor radiosensibilidad de la neoplasia pero en asociación con los demás factores pronóstico conocidos en cáncer de CyC, principalmente el estado ganglionar.^{6,7}

Aún nos se sabe si la presencia de VPH en pacientes con CECYC implique algún cambio en la terapia habitual; ha sido propuesto que la determinación de VPH en estos pacientes debe de hacerse en forma rutinaria con el objeto de identificar subgrupos de pacientes con mejor pronóstico en los que se pueda cambiar la terapéutica habitual con objeto de disminuir morbilidad innecesaria; asimismo se debate sobre la teórica utilidad de la vacunación a la población abierta en contra de el VPH.⁸

El objeto del presente estudio es saber si la presencia de VPH es un indicador de pronóstico en pacientes con CECYC.

▷ MÉTODOS

Se realizó un análisis retrospectivo de los expedientes clínicos de pacientes con diagnóstico de CECYC originado en mucosas y tratados en un período de cuatro años comprendido entre el siete de enero de 2003 y el 26 de enero de 2007.

Tabla 1.

Frecuencia de casos de tumores de cabeza y cuello, de acuerdo con el sitio afectado.

Sitio afectado	Frecuencia n= 179 (%)
Lengua	41 (22.9)
Laringe	59 (32.9)
Piso de la Boca / paladar	20 (11.2)
Labio	14 (7.8)
Orofaringe / amígdala	15 (8.4)
Encía	18 (10.1)
Trígono retromolar / Carrillos	12 (6.7)

Fueron incluidos todos los subsitios del área de cabeza y cuello (CyC), se excluyeron todos los pacientes previamente tratados, los pacientes con carcinoma epidermoide originado en labio fueron incluidos cuando el origen de la neoplasia era la porción mucosa (intra-oral) o del *sulcus*; fueron excluidos todos los carcinomas originados en la porción dérmica labial y por fuera de la cavidad oral.

El tamaño de muestra fue calculado teniendo en cuenta los valores aceptados de nivel de confianza (95%) y poder de la prueba (80%). Para estimar una probabilidad de encontrar 30% de mortalidad en etapas tempranas en relación a la mortalidad esperada en etapas tardías, se estimó un tamaño de muestra de 123 pacientes. La muestra fue estimada en el paquete estadístico EPIINFO 2000 v. 1.1.

Las variables dependientes estudiadas fueron el tiempo de supervivencia, la sobrevida libre de recurrencia y la sobrevida global; las variables independientes fueron la etapa, el estado general del paciente (ECOG), la localización del tumor, la histología y la presencia del virus del papiloma humano.

Determinación del Virus del Papiloma Humano y extracción del ADN. Las muestras se obtuvieron de biopsias y células exfoliadas de pacientes con diagnóstico de carcinoma epidermoide de vías aerodigestivas superiores (VADS). En todos, la muestra fue tomada antes de todo tratamiento y del tumor primario.

Se tomaron 500 ml de las muestras de células exfoliadas colocadas en medio de transporte (DIGENE). Se agregaron 50 ml de proteinasa K (20 mg/mL) y se incubaron a 55° C por dos horas. Las biopsias fueron seccionadas y se les agregó 100 ml de proteinasa K, se incubaron a 55° C por ocho horas. Se extrajo el DNA por el método de *Salting Out* (Miller, Dykes y Polesky, 1988),⁹ se agregó NaCl 5M a cada una de las muestras, se precipitó el ADN con etanol 100% y finalmente se hicieron varios lavados con etanol a 70%.

Tabla 2.

Características de 179 pacientes con cáncer epidermoide de cabeza y cuello

	Lengua n= 14 (%)	Laringe n= 59 (%)	Piso boca / Paladar n= 20	Labio n= 14	Orofaringe / amígdala n= 15	Encía n=18	Carrillos / TR* n= 12	p
Edad								
<50	29.3	3.4	10	7.1	0	0	16.7	.001
50 - 69	26.8	66.1	45	35.7	53.3	50	50	
>70	43.9	30.5	45	57.1	46.7	50	33.3	
Género								
Masculino	46.3	79.7	85	57.1	80	61.1	41.7	.002
Femenino	53.7	20.3	15	42.9	20	38.9	58.3	
Tabaquismo								
	56.1	91.4	80	57.1	80	66.7	66.7	.003
Alcoholismo								
	73.2	83.1	85	85.7	73.3	70.6	58.3	0.4
Tiempo al DX	6.1 ± 8.1	8.7 ± 11	4.9 ± 4.9	17.6±27.5	3.4 ± 2.5	3.7 ± 3.2	6.2 ± 8.4	0.06**
Tiempo de seguimiento	21.7 ± 14.8	20 ± 12.8	10.3 ± 9.9	19.9±13.4	23 ± 14.7	19.7 ± 14.7	20.9 ± 15.9	0.06
Volumen Tumoral	3.3 ± 1.4	2.7 ± 2	4.3 ± 3	3 ± 1	4.4 ± 2.7	3.8 ± 2.3	5.2 ± 3.8	0.03

*Trígono Retromolar

**Los valores de p fueron estimados con el estadístico de Kruskal-Wallis, nivel de significancia del 95%

Amplificación y secuenciación. Para corroborar la integridad del DNA obtenido, se utilizan primers que amplifican un fragmento del gen b-globina. La presencia del virus se determina por medio de la amplificación por PCR con los primers consenso MY09/MY11 y GP5+/GP6+, que amplifican una región del gen L1 de varios tipos diferentes de HPV (de Roda Husman y colaboradores, 1995; Bauer, y colaboradores 1992).¹⁰ 5ml de cada uno de los productos de PCR se corren en gel de agarosa a 2%, para comprobar los resultados. El producto de PCR de las muestras que dieron positivas a las pruebas anteriores se limpian con el *QIAquick PCR Purification kit* (QUIAGEN) y se secuencian directamente para determinar el tipo de VPH.

Análisis de datos. La captura de la información se realizó en una base de datos con el paquete SPSS, en una computadora personal. Para la estadística descriptiva se empleó análisis univariado, obteniendo frecuencias, medias, desviación estándar y medianas. Para comparación de medias se utilizó la prueba de *t* para muestras independientes y para variables cualitativas, estadística no paramétrica con *Ji cuadrada* o Prueba exacta de Fisher, calculando los respectivos intervalos de confianza a 95%. Se realizó análisis descriptivo para sobrevida con Kaplan-Meier y Regresión de Cox para obtener riesgos ajustados.

► RESULTADOS

Se incluyeron 179 pacientes con CECyC con media de edad de 64.5 ± 12.7 años, sin diferencia entre hombres y mujeres ($p = 0.3$). La relación entre ambos géneros fue de 2:1 a favor de hombres (119:60). La distribución por sitios de origen del tumor se muestran en la **Tablas 1 y 2**, en 105 pacientes (58.6%) el tumor se originó en la cavidad oral, seguido por la laringe en 59 (32.9%). El tiempo promedio transcurrido entre el inicio de síntomas y el diagnóstico fue de 7.7 meses, con mediana de tres. El tiempo medio de seguimiento fue de 19 meses, con intervalo de uno a 48 meses. Fue más frecuente en hombres ($p = 0.002$) y menores de 50 años de edad ($p \leq 0.001$), y en fumadores en forma estadísticamente significativa ($p = 0.003$).

Factores pronóstico. No se evidenció diferencia en la sobrevida global en relación al género, tabaquismo, alcoholismo, antecedentes familiares de cáncer, edad, presencia y tipo de ADN del VPH; el único factor que mostró significancia estadística fue la pérdida de peso ($p < 0.001$) al compararse entre el que se tenía antes del inicio de síntomas con el del momento del diagnóstico (**Tabla 3 y Figura 1**). Los principales factores pronóstico de sobrevida identificados fueron el ECOG (2 vs. 0, RR = 9.1; 2.4-34.7 / 3 vs. 0, RR = 11.3; 2.6 - 48) y el estadio clínica (IV B vs. 0 RR = 7.8; 1.7 -34 / IV A vs. 0 RR = 5.6; 1.5

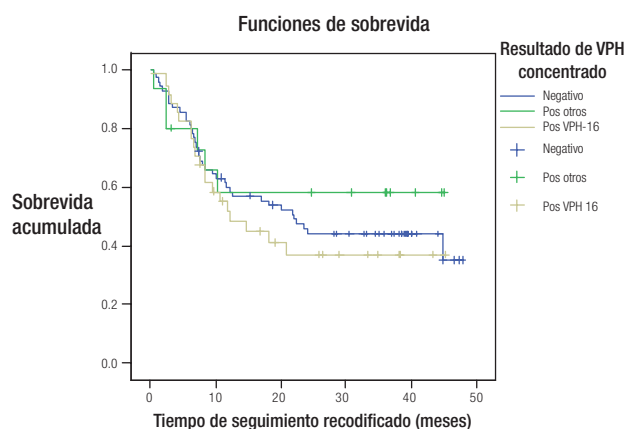
Tabla 3.
Tiempo de sobrevida y factores socio-demográficos.

Variable	n	Defunciones	Sobrevida (%)	Tiempo medio de sobrevida	Intervalo de confianza	p
Género						
Masculino	119	54	54.6	28	25-32	0.812
Femenino	60	29	28	28	23-33	
Tabaquismo						
Positivo	132	59	55.3	29	25-32	0.3
Negativo	46	24	47.8	26	20-32	
Ant. De cáncer familiar						
Positivo	66	30	54.6	30	25-34	0.4
Negativo	112	53	52.7	27	23-31	
Pérdida de peso						
Presente	130	66	48.5	26	22-29	0.0009
Ausente	48	16	66.7	34	29-38	
Edad						
<50	20	8	60	32	24-41	0.15
51-60	44	22	50	27	22-33	
61-70	53	20	62.3	32	27-37	
>70	62	33	46.8	23	18-28	
Alcoholismo						
Positivo	138	62	55	29	26-32	0.33
Negativo	40	21	47.5	25	19-31	
VPH						
Positivo 16	34	20	41.18	22	16-29	0.5
Positivo a otros	15	6	60	28	18-39	
Negativo	68	38	44.12	22	21-31	

*Trígono Retromolar

**Los valores de p fueron estimados con el estadístico de Kruskal-Wallis, nivel de significancia del 95%

Figura 1.
Análisis de sobrevida de acuerdo a la infección de VPH.



- 20.5), valores representados en la **Tabla 4**. Al analizar la supervivencia en pacientes con infección de VPH comparados con los que el ADN del virus no fue identificado no encontramos diferencia estadísticamente significativa, concluyendo que el ECOG, y la etapa son los dos factores pronóstico con mayor peso e independencia en la presente serie (**Figuras 2 y 3**). El intervalo libre de enfermedad se relacionó en forma inversamente proporcional con la etapa clínica en el momento del diagnóstico (**Tabla 5**). Ocho pacientes tuvieron segundos tumores primarios principalmente de origen broncogénico (5%), asociados a la presencia de infección por VPH.

► DISCUSIÓN

El CECyC se diagnostica en el 10% de todas las neoplasia malignas reportadas en el mundo.² En Estados

Tabla 4.

Factores pronóstico ajustados con el análisis de regresión de COX, en pacientes con tumores de cabeza y cuello.

Variable	n	Defunciones	Riesgo relativo (RR)	Intervalo de confianza (IC)
ECOG				
0	16		1	-----
1	102		1.7	0.5-6.1
2	47		9.1	2.4-34.7
3	14		11.3	2.6-48
Sitio				
Lengua	41	18	1	-----
Laringe	59	20	0.54	0.22-1.3
Piso de boca/ paladar	20	16	1.8	0.86-4
Labio	14	5	1.5	0.5-4.4
Orofaringe/ amígdala	15	4	0.4	0.16-1.1
Encía	18	10	0.67	0.27-1.6
Trígono RM/ carrillos	12	6	0.5	0.14-1.7
Edad				
<50	20	9	1	-----
50-69	97	34	1.5	0.6-3.7
>70	62	31	3.5	1.4-8.5
Tipo de tratamiento				
Cirugía	130	47	1	-----
No tratamiento oncológico	12	12	4.9	1.9-12.6
Otros	37	24	0.8	0.4-1.6
Etapa clínica				
I	15	4	1	-----
II	35	13	1.5	0.3-6
III	49	16	1.6	0.4-6
IV A	69	51	5.6	1.5-20.5
IV B	11	10	7.8	1.7-34

Valor de los factores pronóstico analizados en la evolución de los pacientes con carcinoma epidermoide originado en mucosas de cabeza y cuello; el ECOG y la etapa fueron los que mayor impacto tuvieron en el pronóstico.

Unidos, la incidencia es alrededor de 4% a 5%, y representa 2% de todas las muertes por cáncer.² Aproximadamente 72 000 nuevos casos se notifican en hombres y 29 000 casos en mujeres por año, con relación hombre:mujer de 2.5:1. La edad media de presentación es de 60 años; la incidencia se incrementa con la edad.

La OMS ha reportado recientemente un incremento importante en el número de pacientes que son diagnosticados con cáncer de cabeza y cuello, originado principalmente en la lengua; el género masculino mayor de 55 años que consume alcohol y tabaco es el grupo más afectado; sin embargo la frecuencia de ésta neoplasia en

Figura 2.

Análisis de sobrevida de acuerdo a ECOG.

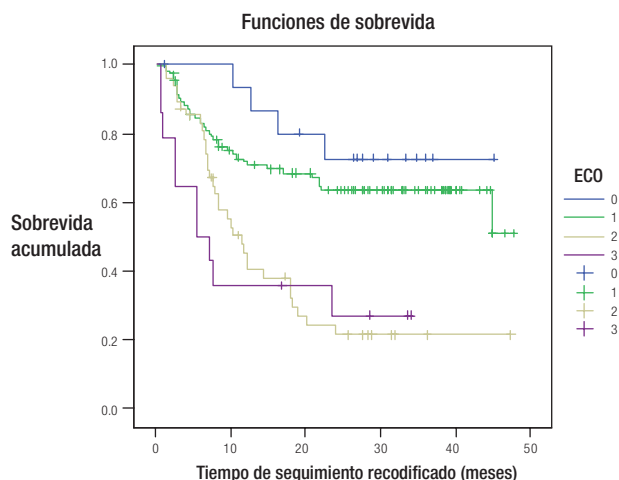
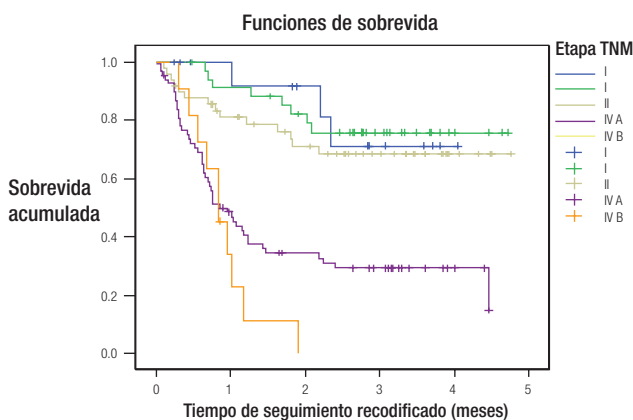


Figura 3.

Análisis de sobrevida de acuerdo con estadio clínico.



mujeres menores de 45 años que no fuman ni beben etanol se ha incrementado en forma exponencial, se estima que esta neoplasia ocupa actualmente el sexto lugar mundial entre todos los tumores.^{11,12}

En México, representa 5% de todas las neoplasias y la cavidad oral es el sitio más frecuentemente afectado.¹³ El Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas de la Dirección General de Epidemiología, de la Secretaría de Salud de México, informó 2619 nuevos casos de cáncer originado en mucosas de cabeza y cuello en el año 2002 y 1844 personas que murieron a causa de ello.¹⁴

La mayor parte de los pacientes en nuestro medio se presentan con enfermedad local o loco-regionalmente avanzada en el momento del diagnóstico (34% y 46%

Tabla 5.

Sobrevida libre de enfermedad.

Etapas clínicas	n	Defunciones	Sobrevida (%)	Tiempo medio de supervivencia	Intervalo de confianza
I	15	4	73.3	32.72	26.5-38.94
II	35	13	62.9	35.34	29.7-41
III	49	16	66.45	34.2	28.8-39.6
IV A	68	51	25	17.6	13.5-21.7
IV B	11	10	9.1	9	6.2-11.9

La supervivencia tiene una relación inversamente proporcional con el estadio en los pacientes con carcinoma epidermoide de cabeza y cuello.

respectivamente) y 10% tienen enfermedad sistémica, lo que explica la alta tasa de letalidad.^{13,14}

Si bien no podemos considerar aún un problema de salud al cáncer de cabeza y cuello en nuestro país, el incremento en el consumo de alcohol y tabaco así como la asociación a la infección por VPH hace prever que en el próximo lustro el número de casos se incremente,¹⁴ afectando principalmente a menores de 40 años y con una relación cada vez con mayor tendencia a la igualdad entre hombres y mujeres; en la presente serie si bien la neoplasia fue más frecuente en hombres vemos ya que la relación ha disminuido en relación a lo clásicamente informado, y la edad ha disminuido de 60 años o más, a menos de 50.

Factores de riesgo. Diversos mecanismos han sido implicados en la génesis de los tumores originados en el epitelio de CyC, el tabaquismo y la ingesta de alcohol son los dos más conocidos y directamente asociados.¹

Otros factores relacionados con la génesis del CE-CyC son alteraciones genéticas e infección por virus, de éstos al menos dos tipos diferentes están estrechamente implicados en la promoción neoplásica; el virus Epstein-Barr y el virus del papiloma humano.¹⁵⁻¹⁷ La infección por VPH ha sido reportada como un co-factor de riesgo con valor independiente, esto es, incrementa la posibilidad de adquirir una neoplasia de la mucosa independientemente de los hábitos conocidos; recientemente se le ha asociado aunque en forma controvertida a mejor pronóstico, en nuestro país ha sido informada la prevalencia del VPH asociada a cáncer de CYC pero no como factor pronóstico.¹⁷

El estadio y sobre todo el estado ganglionar son los factores pronóstico más importantes, aunque en el área cérvico-facial en particular, el subsitio de origen del tumor tiene también un valor independiente en la evolución del paciente, la frecuencia con la que se identifica el VPH varía también de acuerdo al subsitio y parece ser

que varía según la geografía o región; por ejemplo: la frecuencia de VPH en cáncer de esófago en China,¹⁸ es mucho mayor que en la reportada en las series europeas y americanas.¹⁹⁻²¹

El motivo por el cual el pronóstico de los pacientes con VPH es mejor que el de los que no lo tienen no es claro, se ha sugerido que la inmunidad a los antígenos virales y la ausencia de campo de cancerización (en pacientes no fumadores), confieren una mejor respuesta apoptótica. La falta de un *campo de cancerización* el cual es condicionado por el uso crónico de alcohol-tabaco podría justificar el hecho de que la tasa de segundos primarios en el área cervico-facial fuese menor y por lo tanto la mortalidad disminuyese en éste grupo de pacientes aunque esta tesis no está aún dilucidada.

Hasta este momento, el factor pronóstico de mayor peso es la etapa clínica, relacionándose en forma inversamente proporcional a la supervivencia global, es decir, en los pacientes con etapas tempranas (I-II) la supervivencia a cinco años es mayor a 80%, mientras en etapas tardías (III-IV) es menor a 40%, independientemente de la asociación de tratamientos recibidos.

En el presente estudio fueron analizados 179 pacientes con carcinoma epidermoide originado en mucosas de cabeza y cuello con el propósito de identificar los factores pronóstico de control loco-regional y supervivencia.

En nuestra serie se encontró que el ECOG fue un factor pronóstico determinante con significancia estadística. La pérdida de peso (asociada al estado general del paciente) tiene impacto en la supervivencia, estos hallazgos pueden estar relacionados con factores socio-demográficos de nuestra población (nivel económico y estado nutricional). Aunque no encontramos diferencia significativa en el pronóstico en pacientes VPH+, probablemente por el número de efectivos, un hallazgo interesante fue que aquellos que fueron VPH+ y recibieron radioterapia como parte del tratamiento tuvieron mejor control local y supervivencia aunque no en forma estadísticamente significativa, probablemente el incluir un mayor número de pacientes podría darle validez a este hallazgo.

REFERENCIAS

- Gallegos-Hernández JF El cáncer de cabeza y cuello. Factores de riesgo y prevención. *Cir Ciruj* 2006;74(4):287-293.
- Parkin DM, Bray FI, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer* 2001;94:153-156.
- Gallegos-Hernández JF, Hernández-Hernández DM, Flores-Díaz R, et al. Frequency and types of human papilloma-virus in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head & Neck Surg* 2006;Supl:160.
- Sikoara AG, Morris LGT, Shurgis EM. A population-based analysis of the association of oral/pahryngeal carcinomas with HPV-related anogenital cancers in men. S-361. *Proceedings of the 7th International Conference on Head and Neck Cancer*. San Francisco, Ca. 2008.

5. Yohodom R, Bedrin L, Vered M, et al. Squamous cell carcinoma of oral tongue in young adults: a clinical and pathological analysis of risk etiological entity. S363. Proceedings of the 7th International Conference on Head and Neck Cancer. San Francisco, Ca. 2008.
6. Hafkamp HC, Haesevoets A, Voogd AC, et al. Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer* 2008;122(12):2656-2664.
7. Shiboski CH, Da Costa MM, Palefsky JM, Jordan RCK. Lack of association between HPV infection and oral tongue carcinoma in young and older patients. S362. Proceedings of the 7th International Conference on Head and Neck Cancer. San Francisco, Ca. 2008.
8. Lawrence J. HPV-linked oral cancer: another argument for universal HPV vaccination of boys and girls. *AIDS Read* 2008;18:345-346.
9. Mineta H, Ogino T, Amano HM. Human papilloma virus (HPV) type 16 and 18 detected in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 1998;18: 4765-4768.
10. Chen B, Yin H, Dhurandhar N. Detection of human papillomavirus DNA in esophageal squamous cell carcinomas by the polymerase chain reaction using general consensus primers. *Hum Pathol* 1994;25:920-923.
11. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45:309-16-17.
12. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C y cols. **Cancer statistics.** *CA Cancer J Clin* 2006;56:106-130.
13. México. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología. Compendio del registro histopatológico de neoplasias en México: morbilidad y mortalidad 1996:130.
14. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. InforCompendio de Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México 1993-1997. Disponible en <http://www.degepi.salud.gob.mx>.
15. Gulley ML. Molecular diagnosis of Epstein-Barr virus-related diseases. *J Mol Diagn* 2001;3:1-10.
16. Jarret WFH. Environmental carcinogens and papillomaviruses in the pathogenesis of cancer. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 1987;231:1-11.
17. Gallegos-Hernández JF, Hernández-Hernández DM, Flores-Días R, Arias-Ceballos H, Minauro-Muñoz GG, Hernández-Sanjuan M, y cols. Human papilloma-virus in head and neck cancer patients. 1st. Meeting. International Academy of Oral Oncology. Amsterdam, the Netherlands. Mayo.2007. Abst.P138. *Oral Oncol Head & Neck Oncol & Pathol* 2007;Suppl:173.
18. Chang F, Syrjänen S, Shen Q, Ji H, Syrjänen K. Human papillomavirus (HPV) DNA in esophageal precancer lesions and squamous cell carcinomas from China. *Int J Cancer* 1990;45:21-25.
19. Smit HL, Tjong-A-Hung SP, Ter Shegget J, Nooter K, Kok T. Absence of human papillomavirus DNA from esophageal carcinoma as determined by multiple broad spectrum polymerase chain reactions. *J Med Virol* 1995;46:213-215.
20. Brandsma JL, Abramson AL. Association of papillomavirus with cancers of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989;115:621-625.
21. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, et al. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997;79:595-604.