



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA NORMAL Y PATOLÓGICA

**APROXIMACIÓN AL ESTUDIO BIOMOLECULAR DEL
CARCINOMA NASOFARÍNGEO**

María Teresa González Serrano
Sevilla, 2010



Citología e Histología Normal
y Patológica

Don HUGO GALERA DAVIDSON, CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD, Don MANUEL DE MIGUEL RODRÍGUEZ, Prof. CONTRATADO DOCTOR, ADSCRITOS AL DPTO. DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA NORMAL Y PATOLÓGICA, y Don HUGO GALERA RUIZ, Prof. ASOCIADO ADSCRITO AL DPTO. DE CIRUGÍA; DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICAN: Que bajo su dirección y en el Citología e Histología Normal y Patológica, se ha realizado el trabajo titulado: “**APROXIMACIÓN AL ESTUDIO BIOMOLECULAR DEL CARCINOMA NASOFARÍNGEO**” PRESENTADO POR Doña **M^a TERESA GONZÁLEZ SERRANO** para optar al grado de Doctor en Medicina.

Sevilla, 13 de Septiembre de 2010

AGRADECIMIENTOS

No quisiera, a la conclusión de este trabajo, que queden en el anonimato aquellos que lo hicieron posible, los únicos realmente imprescindibles. Por ello, tengo que incluir mi agradecimiento hacia ellos, como parte fundamental de esta Tesis:

En primer lugar, al Prof. Hugo Galera Davidson, Director del trabajo. Hombre de espíritu emprendedor, de entusiasta vocación médico-científica, de amplios horizontes y vitalidad inagotable. Su trayectoria profesional le avala. Abierto siempre a la ilusión, ha sabido alentar la inquietud por la investigación, sin olvidar la perspectiva médica y humana.

Al Prof. Manuel de Miguel Rodríguez, co-director de esta Tesis. Por su apoyo incondicional y desinteresado, por su paciencia y amistad.

Al Prof. Hugo Galera Ruiz, co-director de esta Tesis, por los aportes al conocimiento desde su especialidad.

Deseo hacer constar mi agradecimiento a la Dra. Vargas, Maite, por acogermme en su Laboratorio de Genética, por su generosidad, sabiduría y dinamismo. Gracias por enseñarme más allá de lo puramente científico.

Al Prof. Ricardo González-Cámpora. Gracias por atender y aconsejar tan acertadamente, por su paciencia y comprensión durante los años de la residencia y para la realización de este trabajo.

A los Dres. Ibáñez, Villar, Ríos y García (Pepe, José Luís, Juanjo y Antonio). Mis adjuntos y mis amigos. Gracias por todo lo que he aprendido y continúo aprendiendo. Gracias por estar siempre.

A todos los componentes del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Virgen Macarena, por su buen hacer diario. A todos los Adjuntos del Departamento. A todos mis compañeros de residencia, especialmente a la Dra. Pareja y al Dr. Segura, por su apoyo en los momentos felices y no tan felices. Al Dr. Casco por su aportación a este trabajo de forma desinteresada y por su tiempo. A todos los técnicos, mención especial a Amparo Arjona que tanto me ha ayudado en el laboratorio y fuera de él. A M^a Dolores Montero por prestarme su ayuda siempre que se la pedí.

A Eduardo Solís García e Inmaculada Ruiz Molina, adjuntos del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Infanta Margarita de Cabra (Córdoba), mis compañeros de trabajo y amigos por su inestimable ayuda, apoyo y comprensión. También a Jorge Martínez Robles por su ayuda desinteresada para la realización de este trabajo.

A todos mis amigos que sin formar parte de la Anatomía Patológica la han vivido conmigo. A Pepa, Joaquín y Juanita, por sus conocimientos, dedicación, paciencia y su amistad. A Pepe y Fali por ser mis amigos de toda la vida y estar ahí siempre. A Antonio y José Manuel, por sus consejos muy importantes para mí y por ser “la voz de mi conciencia”. A Inma. Elena, Marisa y Clara por su amistad incondicional y haber compartido todos mis momentos. Con vosotros aprendo a ser mejor persona.

A mis padres, José María y María Teresa, por su continua entrega, dedicación, y su grandísima paciencia. A mi hermana Marta por su apoyo afectivo y logístico.

“La esperanza de erradicar la enfermedad yace en los sueños, en la imaginación y en la valentía de aquellos que se atreven a convertir los sueños en realidad”

Jonas Salk

A mis padres
A mi hermana



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	9
A.- ANATOMIA DE LA FARINGE	11
1.- Topografía	11
a.- Rinofaringe (cavum, nasofaringe, epifaringe)	11
b.- Orofaringe (mesofaringe)	12
c.- Hipofaringe.....	13
2.- Estructura	14
a.- Epitelio faríngeo.....	14
b.- Elementos linfoides.....	14
c.- Musculatura faríngea	16
3.- Relaciones	20
4.- Vascularización e inervación.....	21
a.- Vascularización.....	21
b.- Inervación.....	22
B.- CARCINOMA DE LA NASOFARINGE.....	23
1.- Epidemiología.....	24
a.- Incidencia.....	24
b.- Distribución por edad y sexo.....	25
c.- Distribución histológica.....	26
2.- Etiología.....	27
a.- Virus de Epstein Barr.....	27
b.- Factores ambientales.....	33
c.- Anomalías genéticas.....	33

d.- Tipo HLA.....	47
3.- Morfología del CNF.....	48
a.- Generalidades de la Nasofaringe.....	48
b.- Clasificación de los CNF.....	51
c.- Extensión tumoral.....	53
4.- Diagnóstico del CNF.....	54
a.- Signos clínicos.....	54
b.- Exploración física.....	56
c.- Estudios complementarios.....	59
5.- Clasificación anatomoclínica del CNF.....	63
6.- Formas clínicas del CNF.....	64
a.- Infantil.....	64
b.- Adulto.....	64
c.- Localizada.....	64
d.- Metastásica.....	66
7.- Diagnóstico diferencial del CNF	66
a.- Linfomas.....	66
b.- Tumores de tejidos blandos.....	66
c.- Melanoma.....	67
d.- Adenocarcinoma	67
PLANTEAMIENTO DEL TEMA.....	69
MATERIAL Y MÉTODOS.....	73
A.-ESTUDIOS CLÍNICOS.....	75

B.- MÉTODOS	78
1.- Estudios histológicos.....	78
2.- Estudio inmunohistoquímico	78
3.- Estudio molecular.....	80
4.- Estudio estadístico.....	83
a.-Objetivos.....	83
b.- Variables.....	83
c.- Estudios realizados.....	84
RESULTADOS	87
A.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS	89
B.- CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS	95
C.- FISH EN CARCINOMA NASOFARÍNGEO	98
D.- ESTUDIO ESTADÍSTICO	100
1.- Asociación entre variables clínicas y histológicas.....	100
2.- Asociación entre variables clínicas, histológicas, e inmunohistoquímicas.....	103
3.- Asociación entre variables clínicas, morfológicas, inmunohistoquímicas y FISH.....	107
DISCUSIÓN	113
CONCLUSIONES	127
BIBLIOGRAFÍA	131

ABREVIATURAS

AJC/UICC: American Joint Committee on Cancer Staging/Union Internationale Contre Le Cancer.

CCND1: Ciclina D1.

CDK: Quinasa dependiente de ciclina.

CNF: Cáncer nasofaríngeo.

EA: Antígeno precoz.

EBNA: Antígeno nuclear del virus de Epstein Barr.

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico

ELISA: Análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas.

EMA: Antígeno de Membrana Epitelial.

FRBL: Faringe retrobasilingual.

FISH: Hibridación *in situ* con Fluorescencia.

GST: Genes Supresores Tumorales.

HGC: Hibridación Genómica Comparada.

HLA: Antígenos Leucocitarios Humanos.

IF: Inmunofluorescencia.

LMP: Proteína Latente de Membrana.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa.

pRb: proteína del retinoblastoma.

PET: Tomografía por Emisión de positrones.

RM: Resonancia Magnética.

SLE: Supervivencia Libre de Enfermedad.

TC: Tomografía Computerizada.

VCA: Antígeno de la Cápside Viral.

VEB: Virus de Epstein Barr.

VF : Velofaringe.



INTRODUCCIÓN

A.- ANATOMÍA DE LA FARINGE

El objetivo de este apartado no es ofrecer un estudio anatómico exhaustivo sino insistir sobre ciertas nociones de definición topográfica, de histología, de vascularización y de inervación, importantes para la comprensión y sistematización de la faringe⁽¹⁻⁷⁾.

1. Topografía

La faringe es un conducto con un eje mayor vertical, constituido por cuatro paredes que delimitan una luz central. En el adulto, este conducto faríngeo alcanza una longitud de 12 a 13 cm, adelgazándose ligeramente de arriba abajo. Se divide de forma bastante arbitraria en tres niveles (**fig. 1**):

a) Rinofaringe (cavum, nasofaringe, epifaringe)

Presenta importantes variaciones individuales de tamaño y forma, en su parte superior limita con la base del cráneo y por debajo, con un plano horizontal que pasa por el paladar óseo. Así, en posición de reposo, el velo forma parte de la orofaringe y no de la rinofaringe. El cavum se abre por delante hacia las fosas nasales por las coanas. Lateralmente, se encuentran los orificios faríngeos de las trompas de Eustaquio, los pliegues tubáricos e inmediatamente detrás de ellos, las fosetas de Rosenmüller (recesos faríngeos). La pared superior, de forma ojival, comprende dos restos embrionarios, la hipófisis faríngea y la bolsa faríngea. La hipófisis faríngea, elemento muy anterior de la pared superior, es un resto de la celdilla embrionaria de la hipófisis

(celdilla de Rathke). La bolsa faríngea (de Luschka) es un vestigio mediano resultante de la adherencia del endodermo faríngeo al notocordio, por lo general simple surco y a veces una pequeña celdilla diverticular que puede convertirse en el centro de una inflamación crónica y de retención de secreciones. A la pared superior le sigue la pared posterior y vertical, que está a la altura del cuerpo del atlas.

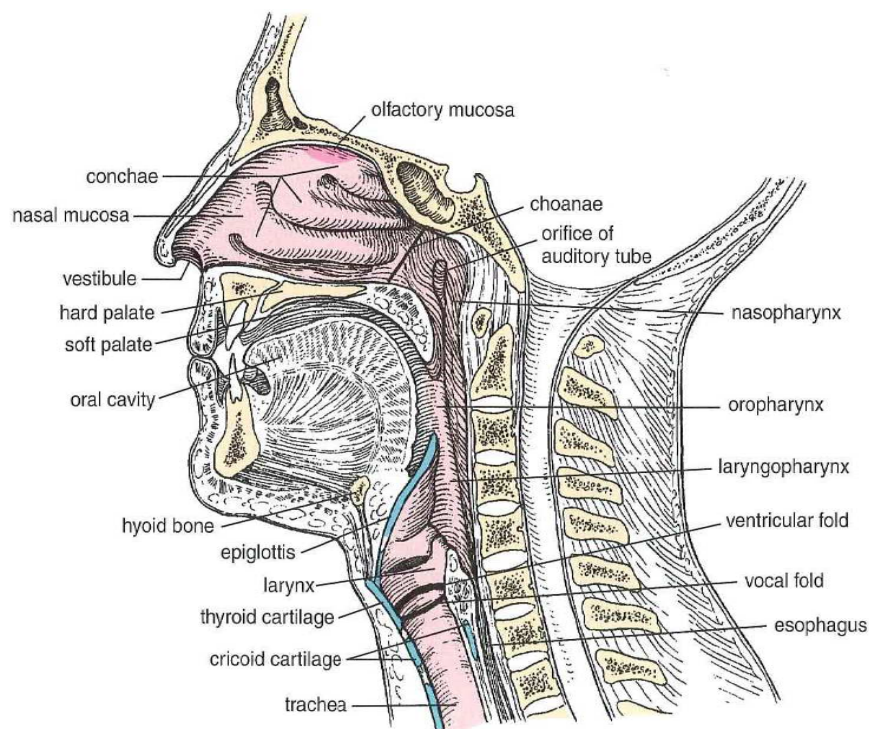


Figura 1: Anatomía de la Faringe

b) Orofaringe (mesofaringe)

Se extiende desde el plano horizontal que pasa por el paladar duro hasta el plano horizontal que pasa por el borde superior del hueso hioides. La pared posterior de la orofaringe está a la altura de

los cuerpos de la 2ª y 3ª vértebras cervicales. Lateralmente se encuentran las zonas amigdalares. La mitad superior de la pared anterior está constituida por un orificio: el istmo de las fauces, limitado por los pilares anteriores. La mitad inferior de la pared anterior de la orofaringe se halla representada por la base de la lengua, las valéculas y la parte suprahioidea de la epiglotis.

Aunque la nomenclatura internacional no divide la orofaringe, resulta más cómodo considerar dos sectores: la velofaringe (VF) y la faringe retrobasilingual (FRBL). La velofaringe constituye la parte alta de la orofaringe y comprende el velo y el istmo faringonasal, limitando con los pilares posteriores. Su función es básicamente fonatoria y esfinteriana. La faringe retrobasilingual limita en su pared anterior con la base de la lengua, las valéculas y la epiglotis suprahioidea, desempeñando un papel esencial en la deglución⁽⁸⁾.

c) Hipofaringe (laringofaringe)

Se extiende desde el plano horizontal, pasando por el borde superior del hueso hioides, hasta llegar a la boca del esófago. Por detrás se relaciona con los cuerpos vertebrales de la 4ª, 5ª y 6ª vértebras cervicales. Por delante, su parte superior corresponde al orificio superior de la laringe y la inferior, a la pared faringolaríngea, levantada por la lámina cricoidea y los aritenoides. La parte lateral de la hipofaringe está formada por los senos piriformes, mientras que la parte media se denomina zona retrocricoidea. Por debajo, la

hipofaringe termina por la boca esofágica que corresponde a la entidad fisiológica del esfínter superior del esófago.

2. Estructura

De adentro afuera, la pared faríngea está formada por un revestimiento mucoso rico en elementos linfoides, la túnica fibrosa, la capa muscular y finalmente, la aponeurosis perifaríngea. Se presentará una recapitulación detallada de los diferentes elementos constitutivos para una mejor comprensión de la patología epitelial y linfoide faríngea, así como la de los músculos de la faringe y de los trastornos de la deglución.

a) Epitelio faríngeo

El revestimiento de la epifaringe está formado por una mucosa de epitelio ciliado pseudoestratificado que se prolonga en un epitelio pluriestratificado de tipo escamoso no queratinizado, presente en la orofaringe y en la hipofaringe.

b) Elementos linfoides

La capa epitelial de la faringe es lo suficientemente laxa (epitelio reticulado) como para que las células linfocitarias y macrofágicas puedan colonizarla en gran número. El término tejido linfoepitelial corresponde a una entidad anatomofuncional que resulta de la estrecha relación entre las células epiteliales y linfocitarias en la superficie de la mucosa. La unidad linfoepitelial está constituida por un folículo secundario, un tejido linfoide difuso de sostén, una arteriola, una vénula y por venas postcapilares recubiertas de un epitelio

escamoso. En todas las mucosas pueden observarse unidades linfoepiteliales solitarias (folículo solitario) o linfocitos dispersos en el epitelio. En la entrada de las vías aerodigestivas, en la orofaringe y en la rinofaringe, existen formaciones organizadas de tejido linfoepitelial que se reagrupan bajo el término de anillo de Waldeyer. Estos órganos linfoepiteliales son las amígdalas. De arriba abajo se puede distinguir:

- la amígdala faríngea (vegetación adenoide): Impar, endoluminal y no capsulada. Situada sobre el techo y la pared posterior de la rinofaringe;
- la amígdala tubárica: Par y endoluminal. Situada alrededor del ostium tubárico, en la foseta de Rosenmüller, que confluye con la amígdala faríngea;
- la amígdala palatina: Par y capsulada. Situada entre los pilares anteriores y posteriores del velo del paladar;
- la amígdala lingual: Impar y no capsulada. Submucosa, situada en la zona basilingual. Esta es menos constante y no está bien caracterizada;
- los pliegues faríngeos (falsos pilares) que ascienden verticalmente casi hasta las paredes posterior y lateral de la orofaringe;
- los acúmulos linfoepiteliales del vestíbulo laríngeo.

c) Musculatura faríngea

Los diez músculos de la pared faríngea, pares y simétricos (cinco de cada lado), se dividen en dos grupos según su acción:

- los músculos constrictores o intrínsecos, formados por fibras transversales u oblicuas, tienen por función estrechar la faringe;
- los músculos elevadores o extrínsecos, estrechos y alargados, compuestos de fibras longitudinales, cuya función es la de elevar y encoger la faringe.

Cabe destacar que, contrariamente a la disposición de la musculatura del aparato digestivo, los músculos de fibras circulares son internos con respecto a los músculos longitudinales.

n Músculos constrictores

Los músculos constrictores de la faringe son músculos planos, delgados, curvos, formando un canal cóncavo hacia delante. Están unidos a la cara externa de la túnica fibrosa faríngea, con la cual se confunden en la parte media de la pared posterior, constituyendo así el rafe faríngeo. De arriba abajo, los músculos constrictores se recubren parcialmente, de la misma manera que las tejas sobre un tejado. Sin embargo, esta capa muscular se ve interrumpida por intersticios musculares, que son otros tantos puntos débiles de los cuales algunos abren paso a elementos vasculonerviosos.

- El músculo constrictor superior de la faringe es el más profundo, ancho y fino de todos los músculos constrictores. Ocupa el tercio superior de la faringe, sus fibras superiores se unen por detrás a la base del cráneo a la altura del tubérculo faríngeo. Aunque lateralmente no reviste la parte superior de la túnica fibrosa faríngea, este hiato muscular no representa una zona de fragilidad. Por delante, sus fibras se terminan en el ala interna de la apófisis pterigoides, en el ligamento pterigomandibular y en la parte posterior de la línea milohioidea, mientras que algunas fibras se pierden en la base de la lengua.
- El músculo constrictor medio de la faringe ciñe la parte media de la faringe a nivel de C3 y C4. Por delante, se inserta en el hueso hioides por medio de dos haces: el haz condrofaríngeo, que se fija sobre el asta menor, y el haz ceratofaríngeo, que se une al asta mayor.
- El músculo constrictor inferior de la faringe es el más extenso y el más superficial de todos los músculos constrictores. Comprende dos haces: el haz superior, que se inserta en el cartílago tiroides y el haz inferior, que se inserta en el cricoides. A este último también se le conoce como músculo cricofaríngeo. El cuerpo muscular del músculo constrictor inferior forma una amplia capa cuyas fibras superiores, ascendentes y oblicuas, se entrecruzan con sus homólogas contralaterales a la altura del

rafe mediano, mientras que las fibras del haz cricoideo son horizontales, circulares y sin inserción en el rafe. De esta manera, el haz cricoideo del constrictor inferior tiene una estructura muy particular que debe relacionarse con su función fisiológica contingente muscular, muy específica, que forma la boca esofágica y determina la zona de alta presión del esófago superior.

n Músculos elevadores

La faringe posee un aparato elevador constituido, no sólo por las fibras ascendentes de los constrictores medio e inferior, sino también y sobre todo por dos músculos específicos: el estilofaríngeo y el faringopalatino (o faringoestafilino). Estos músculos, pares y simétricos, sólo forman parte de la pared faríngea en su porción inferior.

El músculo estilofaríngeo se inserta a la altura de la parte anterointerna de la base de la apófisis estiloides. Su parte superior es estrecha. Su parte inferior, ancha y fina, se integra en la pared lateral de la faringe. Sus fibras posteriores se insertan en la túnica faríngea, mientras que sus fibras anteriores se dividen en dos haces, uno que se dirige hacia el borde lateral de la epiglotis participando en la constitución del pliegue faringoepiglótico y otro que progresa por el pliegue aritenoepliglótico, antes de unirse al borde posterosuperior del

cartílago tiroides y luego del cricoides. Es un músculo no sólo elevador, sino también dilatador.

El músculo faringopalatino o músculo faringoestafilino se inserta hacia arriba en la cara ventral de la aponeurosis del velo, desciende verticalmente levantando el relieve del pilar posterior y se divide en dos haces en su parte inferior: un haz faríngeo que se intrinca con las fibras del músculo estilofaríngeo y un haz tiroideo que se une al borde superior del cartílago tiroides. Su contracción estrecha el diámetro transversal de la faringe por aproximación de los pilares posteriores.

n Hiato y puntos débiles

El hiato superior de la faringe se sitúa entre los dos haces del músculo constrictor medio, por encima del borde superior del asta mayor del hueso hioides y abriendo paso a la arteria lingual.

El hiato medio de la faringe limita con los músculos constrictor medio e inferior; el nervio faríngeo superior discurre sobre ellos antes de perforar la membrana tirohioidea. El hiato inferior de la faringe está comprendido entre los haces tiroideo y cricoideo del músculo constrictor inferior. Después de pasar por debajo del haz cricoideo del constrictor (pinza cricofaríngea), el nervio faríngeo inferior (o nervio recurrente) discurre por el área del hiato inferior.

Para poder comprender la historia natural de los divertículos faringoesofágicos, es importante conocer los puntos débiles posteriores, impares y mediales, contrariamente a los hiatos que son

laterales y pares⁽⁹⁻¹³⁾. Se describen dos puntos débiles superficiales y un punto débil profundo. El punto débil superficial superior se relaciona con una dehiscencia entre los dos haces del constrictor inferior de la faringe (triángulo de Laimer). El punto débil superficial inferior es una dehiscencia que aparece entre el cricofaríngeo y la musculatura esofágica. Para Guerrier y cols (1923), el «punto débil es ante todo un punto débil profundo entre los dos músculos palatofaríngeos»; una vez que la mucosa se insinúa en esta zona débil de la capa longitudinal interna, «el paso del constrictor inferior se hace por puntos muy variables, pero siempre por encima del músculo cricofaríngeo o a través del mismo» (Guerrier niega así la existencia del punto débil superficial inferior, con lo cual los divertículos de Zenker son más bien divertículos hipofaríngeos y no faringoesofágicos).

3. Relaciones

Más que examinar la anatomía con todo detalle, se pretende determinar las principales relaciones que pueden explicar algunos signos funcionales.

Por detrás, la faringe está separada de la columna cervical por la aponeurosis prevertebral, engrosada, que se apoya en los músculos rectos anteriores mayores de la cabeza, en los músculos profundos del cuello y en el arco anterior del atlas. Entre la faringe y la aponeurosis prevertebral, existe un espacio celuloganglionar retrofaríngeo (espacio de Gillette). La

invasión tumoral o la inflamación del espacio de Gillette son responsables de una tortícolis característica. Lateralmente, la faringe se relaciona con:

- la fosa infratemporal; en su parte superior (nasofaringe);
- el espacio parafaríngeo, por delante, y con el espacio subparotídeo posterior por detrás; en su parte media;
- en su parte inferior: con la zona carótida.

Estas relaciones laterales justifican la expresión faríngea de algunas masas cervicales y algunas veces las manifestaciones cervicales de algunas enfermedades, principalmente tumorales, de la faringe.

4. Vascularización e inervación de la faringe

a) Vascularización

La vascularización arterial se realiza en las ramificaciones de la carótida externa, a saber: la arteria faríngea ascendente, la arteria palatina ascendente, las ramificaciones amigdalares de la arteria facial, las ramificaciones de la arteria maxilar interna y de la arteria lingual. De todas las ramificaciones de la carótida externa, la arteria faríngea ascendente es, sin lugar a dudas, la menos conocida. Sin embargo, ella garantiza la irrigación esencial de la faringe y, en patología, alimenta un gran número de fibromas nasofaríngeos y tumores del glomo timpánico. La arteria faríngea ascendente nace en la cara posterior de la carótida externa, a la altura de la arteria lingual, raramente por debajo, a menudo inmediatamente por encima. Se puede dividir en tres partes: una ascendente (porción faríngea), una

parte curva y una parte descendente (ramificación palatina de Weber). De la parte ascendente surgen tres arterias faríngeas (inferior, media y superior), la arteria tonsilar superior y una ramificación prevertebral. La arteria meníngea posterior, la arteria tubárica inferior y la arteria timpánica parten de la parte curva. De la parte descendente salen las ramificaciones para el constrictor superior de la faringe. Resaltan las abundantes anastomosis en la pared faríngea, entre las colaterales derechas e izquierdas, que hacen de la faringe un órgano particularmente bien irrigado que no teme las ligaduras arteriales. El drenaje venoso se efectúa desde el tronco tirolinguofacial y el plexo pterigoideo hacia la vena yugular interna.

En la mayoría de los casos, el drenaje linfático se dirige directamente hacia los ganglios linfáticos cervicales. En el niño, los colectores linfáticos drenan hacia los ganglios retrofaríngeos situados en el espacio de Gillette. Luego, los ganglios retrofaríngeos involucionan, aunque su invasión puede constatarse en algunas patologías tumorales de la faringe del adulto. La parte inferior de la faringe también drena hacia los ganglios linfáticos paratraqueales, estableciéndose así una comunicación con el sistema linfático bronquial y torácico.

b) Inervación

Los músculos faríngeos reciben su inervación motriz del nervio glossofaríngeo, del neumogástrico, del hipogloso mayor y de la

ramificación interna del espinal y del nervio facial. La inervación sensitiva de la rinofaringe procede del nervio maxilar superior, ramificación del trigémino; la de la orofaringe proviene del nervio glossofaríngeo y la de la hipofaringe del nervio neumogástrico, principalmente por medio del nervio laríngeo superior.

B.- CARCINOMA DE LA NASOFARINGE

Las primeras publicaciones referentes al cáncer nasofaríngeo (CNF) datan de 1901, con la descripción de 14 casos de Jackson y cols y, después, con la de 22 pacientes en 1922 por New, seguida de la de Digby en 1941, que constaba de 114 pacientes⁽¹⁴⁾.

El cáncer de la nasofaringe (también denominada cavum o epifaringe) es un carcinoma en más del 90% de los casos, de los que el carcinoma nasofaríngeo de tipo indiferenciado (CNFTI) es el más frecuente (14, 15,16).

Al contrario que los demás carcinomas de las vías aerodigestivas superiores, el CNF, sobre todo en las zonas de endemia, afecta a pacientes más jóvenes (de los que un 5-10% son niños menores de 18 años), a menudo no fumadores ni bebedores de alcohol, y tiene una relación especial con el virus de Epstein-Barr (VEB)⁽¹⁵⁻¹⁸⁾. La incidencia elevada (10-30/100.000) o moderadamente elevada (1-10/100.000) en las zonas endémicas de los países del sudeste asiático y del Magreb contrasta con la baja cifra (<1/100.000) de los países europeos y anglosajones⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

El perfil del CNF es parecido al del cáncer evolutivo con un potencial metastásico visceral elevado (hueso, pulmones, hígado), que es la causa principal de fracaso terapéutico^(15-17,20).

La actualización de las clasificaciones anatomoclínicas ha permitido obtener una estadificación mejor de la lesión, que se correlaciona de forma estrecha con el pronóstico⁽²⁰⁾.

La elevada radiosensibilidad del CNF permite un control locorregional muy satisfactorio, que se potencia por la asociación de la quimioterapia concomitante para las lesiones con afectación ganglionar cervical extensa (N2-3) o con un volumen tumoral nasofaríngeo elevado (T4)^(14-17, 20).

1. Epidemiología

a) Incidencia

El CNF, que en más del 90% de los casos es de tipo epidermoide, es infrecuente y esporádico en los países occidentales, con una incidencia $<1/100.000$; y endémico en los países de la cuenca mediterránea, en el Magreb y, sobre todo, en el sudeste asiático⁽¹⁶⁻²¹⁾ (**Fig. 2**). En esta última región, la incidencia varía de 20 al 50/100.000, siendo máxima en el sudeste de China (Kwantung) y en Hong Kong⁽¹⁷⁻²⁰⁾, ciudad donde es del 20,2/100.000 en los varones y del 7,8/100.000 en las mujeres. En la última década se ha observado una disminución de la proporción mortalidad (estandarizada por la edad)/incidencia, que se explica por la reducción del consumo de pescado seco salado en la alimentación infantil, que

es una fuente de nitrosaminas cancerígenas, así como por el desarrollo socioeconómico de las regiones del sudeste asiático ^(19, 20).

En las zonas donde la frecuencia es intermedia (Magreb y países del entorno mediterráneo), la incidencia varía de 3 a 7/100.000 ^(17- 22).

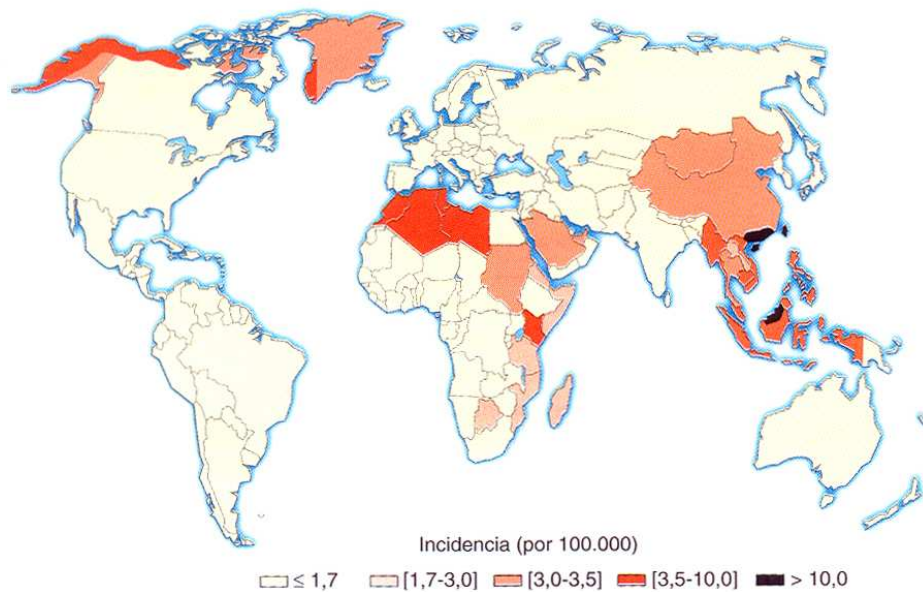


Figura 2. Distribución mundial del cáncer de la nasofaringe en función de la incidencia (según M. Cobres, Médecine et Sciences 2004).

En Europa y en Estados Unidos, el CNF es una enfermedad mucho más infrecuente y esporádica, con una estimación reciente de la incidencia en Estados Unidos (Lee y cols) de 0,7/100.000 en un estudio retrospectivo realizado desde 1973 a 1999 sobre 4.860 pacientes ⁽²¹⁾.

b) Distribución por edad y sexo

El promedio de la edad de aparición del CNF varía según la zona geográfica y el tipo histológico (indiferenciado o no). En los países del

sudeste asiático, el CNF se observa a partir de los 20 años, con un pico alrededor de los 50 años ^(18, 20, 23). En las series asiáticas, el promedio de edad de aparición suele ser de 50 años (**Tabla I**). En las zonas de riesgo intermedio, como el Magreb, se ha observado una distribución bimodal, con un primer pico entre los 10 y los 24 años, y un segundo a los 50 años ^(22, 24). En Túnez, los casos pediátricos detectados antes de los 18 años representan alrededor del 5% de los cánceres nasofaríngeos, y el tumor maligno epitelial es el más frecuente en oncología pediátrica ²². En Estados Unidos, el promedio de edad de aparición es más elevado, por lo general superior a los 50 años, lo que se explica por la mayor frecuencia de las formas epidermoides diferenciadas, que corresponden a personas de más edad ⁽⁸⁾.

Los varones se afectan con más frecuencia que las mujeres, con un sex-ratio que varía de 2 a 3 ^(14,16, 17, 20, 21, 23).

c) Distribución histológica

El tipo predominante de CNF es el epidermoide, con independencia de la región considerada. La forma indiferenciada (CNFTI) es la más frecuente (**Tabla I**) en las zonas de incidencia alta o intermedia, donde representa más del 80-99% de los casos ^(14, 16, 24). En Estados Unidos, la frecuencia de las formas epidermoides bien diferenciadas puede llegar hasta el 70% según Lee y cols ⁽⁸⁾.

2. Etiología

a) Virus de Epstein-Barr

Las infecciones por el virus de Epstein-Barr (VEB) son una de las etiologías principales del CNF ⁽²⁶⁾. Este virus pertenece a la familia *Herpesviridae*. Los viriones (forma infecciosa del virus) están constituidos por una cápside, una envoltura y una cubierta fosfolipídica.

Tabla I

Perfil epidemiológico de los carcinomas de la nasofaringe.

Autor/Referencia	Gharbi ⁽²⁴⁾	Lee ⁽²¹⁾	Leung ⁽²⁵⁾
Número	2.010	4.860	1.070
País	Túnez	Estados Unidos	China
Período	1969-1985	1973-1999	1990-1998
Incidencia	1,78	0,7	25
Varones/Mujeres	2,4	2,12	2,6
Promedio de edad	38	56,5	48
Extremos	10-70	11-75	15-86
% niños	4	<1	3
% CNFTI	>90	20	91,5

CNFTI: carcinoma nasofaríngeo de tipo indiferenciado.

El VEB es un virus de ADN lineal de doble cadena, de 172 Kb, cuyo mapa se muestra en la **Figura 3**. Consta de dos dominios únicos separados por una región interna (IR), y dos secuencias terminales repetidas (TR). El VEB tiene alrededor de 150 nm de diámetro. El genoma viral es lineal en el virión y puede adoptar una configuración circular en las células objetivo, como episoma, forma en la que el VEB

persiste de forma latente. Entre los cien genes que contiene, sólo se expresan algunos.

El ciclo del VEB presenta dos fases, latente y replicativa ^(26, 27). Durante la fase latente, el VEB expresa seis proteínas nucleares o antígenos nucleares del virus de Epstein-Barr (EBNA) y tres proteínas de membrana o proteína latente de membrana (LMP). Estas proteínas

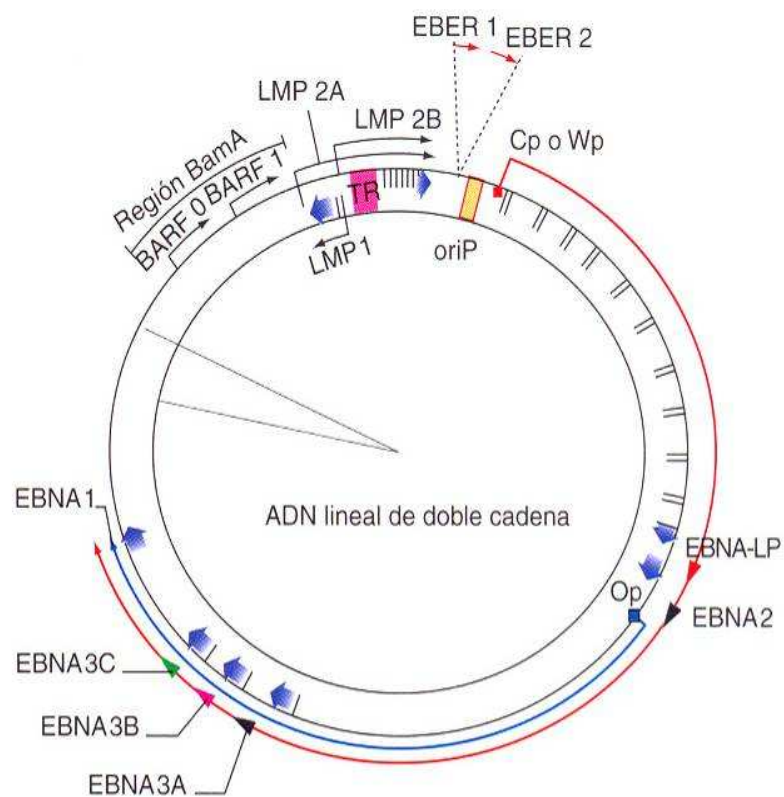


Figura 3. Esquema del virus de Epstein-Barr en su forma latente episódica (según Murria et al.). EBNA; antígeno nuclear de Epstein-Barr; LMP: proteína de membrana latente; EBER: ARN no codificante del virus de Epstein-Barr; ADN: ácido desoxirribonucleico.

de latencia pueden mostrar una variabilidad genética entre las distintas cepas virales. El polimorfismo de los genes que codifican las proteínas EBNA 2 y 3 permite diferenciar los VEB tipo 1 y tipo 2.

Durante el ciclo lítico o productivo, se observa una expresión secuencial de los genes inmediatos, precoces y tardíos. Entre las proteínas que se expresan, el activador de tipo Z de la replicación del VEB (ZEBRA) y el factor R desempeñan una función crucial en el paso de la latencia hacia el ciclo lítico.

Las diferentes proteínas virales expresadas, su localización y su función se recogen en el **Tabla 2** (página 31).

La proteína EBNA 1, que se expresa en el 100% de las células tumorales en biopsias de CNF, desempeña una función destacada en el desarrollo de este cáncer al mantener el genoma viral en el estado episómico en varias copias⁽²⁷⁾. La LMP 1, que se expresa tanto en las células epiteliales como en los linfocitos infiltrantes del CNF, tiene una acción transformante sobre las células infectadas. Se expresa en el 50-65% de los casos de las biopsias tumorales, tanto a nivel de las células tumorales epiteliales como en el infiltrado linfocítico. Mediante el envío de una señal por su dominio C-terminal, la LMP 1 interviene en una etapa precoz de la cascada apoptótica (o muerte celular programada), en un punto anterior a la activación de la caspasa 2⁽²⁸⁾. Las proteínas LMP 2A y LMP 2B se encuentran en el 75% de los casos de CNF. La primera interviene de forma destacada en la

prevención de la activación de la replicación del VEB en las células B infectadas ⁽²⁹⁾. Los ARN no codificantes del virus de Epstein-Barr (EBER) 1 y 2, que son unos ácidos ribonucleicos (ARN) no mensajeros que se transcriben de forma abundante y que están incluidos en las partículas ribonucleicas, se localizan a nivel de los núcleos de las células epiteliales infectadas, y podrían estar implicados en la regulación post-transcripcional de corte-empalme del ARN y de la traducción ⁽³⁰⁾. El transcrito BARF1 suele detectarse en las células de CNF ⁽³¹⁾, con una expresión específica de las células tumorales y las propiedades de un factor de crecimiento.

La frecuencia de detección de las distintas proteínas y transcritos depende de la especificidad y la sensibilidad de las técnicas utilizadas. En la actualidad, se admite que el genoma viral no detectable en las biopsias de tejido nasofaríngeo normal sí se detecta en las muestras de displasias y cánceres *in situ*.

El VEB penetra en el organismo a nivel de la orofaringe y se adhiere de forma específica a ciertas células epiteliales, tras lo que se multiplica y destruye las células infectadas, lo que explica la abundancia de viriones en la saliva ^(14, 26, 27). Los virus liberados por las células epiteliales infectan a continuación los linfocitos B de las estructuras linfoides nasofaríngeas, al fijarse de forma específica a su superficie gracias a la interacción entre la gp350/220 de la cubierta viral y la molécula CD21 de la membrana plasmática. La infección por el VEB provoca una elevación global de la concentración sérica de

inmunoglobulina (Ig) M, IgG e IgA. El perfil serológico típico anti-VEB de un CNF (**Tabla 3**) consiste en un aumento de la IgG y la IgA contra el antígeno precoz (EA) y el antígeno de la cápside viral (VCA), así como de las IgG antinucleares (EBNA).

Tabla 2: Proteínas del virus de Epstein-Barr (VEB), localización y funciones.

Grupo de antígenos	Denominación	Localización (célula/virión)	Función
Antígenos asociados a la latencia EBNA=antígeno nuclear de Epstein Barr LMP=proteínas latentes de membrana	EBNA-1	Núcleo	Mantenimiento del genoma viral en el estado episódico
	EBNA-2	Núcleo	Inmortalización de los linfocitos B
	EBNA-3A EBNA-3B EBNA-3C	Núcleo	Transformación de los linfocitos B
	EBNA-LP	Núcleo	Cruzamiento de las línea linfoblastoides
	LMP-1 LMP-2A y 2B	Membrana	Actividad transformante de las células B+ Prevención de la diferenciación de las célula epiteliales Prevención de la activación de la replicación de las células B infectadas
Antígenos precoces inmediatos ZEBRA=activador de tipo Z de la replicación del VEB	ZEBRA (o EB1)	Núcleo	Transición de la latencia al ciclo lítico (inducción de la expresión de los antígenos precoces)
Antígenos precoces del ciclo ciclo lítico	EA (R)= restricción	Citoplasma	Proteínas de función (inducción de la replicación del genoma viral)
	EA (D)= difuso	Núcleo Citoplasma	Proteínas de función
Antígenos tardíos del ciclo lítico VCA= Antígeno de la cápside viral LMA= Antígeno de membrana tardío	VCA	Núcleo Citoplasma	Proteína estructural (cápside)
	LMA (o gp)	Membranas celulares + cubierta	Proteína estructural (membrana)

n Técnicas de detección del VEB

Los perfiles serológicos en caso de enfermedad benigna o maligna relacionada con el VEB se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Perfiles serológicos de las enfermedades asociadas al virus de Epstein-Barr (VEB)

	VCA IgG	VCA IgM	VCA IgA	EA IgG	EBNA-1 IgG	Zebra IgG
Paciente seropositivo	1/40-1/320	<1/40	<1/40	≤1/40	1/40-1/320	≤1/40
Primoinfección (MNI)	1/640-1/1280	1/40-1/320	≤1/40	≤1/40	<1/40	≤1/40
Linfoma de Burkitt VEB+	>1/1280	<1/40	<1/40	1/640-1/1280	≤1/40	¿?
Carcinoma indiferenciado de la nasofaringe	>1/1280	<1/40	1/40-1/320	1/640-1/1280	1/640-1/1280	1/40-1/320

MNI: mononucleosis infecciosa; Ig: inmunoglobulina; EBNA: antígeno nuclear de Epstein Barr; EA: antígeno precoz; ZEBRA: activador de tipo Z de la replicación del VEB; VCA: antígeno de la cápside viral.

Los anticuerpos anti-VEB aparecen durante la primoinfección según una cinética determinada. Las IgG anti-VCA, que se detectan en todas las primoinfecciones y que están presentes desde el inicio de los signos clínicos, disminuyen y es probable que persistan durante toda la vida. Las IgM anti-VCA, que son el único indicador de certeza de una infección reciente, son constantes en las primoinfecciones agudas y desaparecen en 4-8 semanas. Los anti-EBNA 1 se encuentran tras la mayor parte de las primoinfecciones, pero de forma tardía, nunca antes de 1-3 meses, y persisten toda la vida. Los anti-EA aparecen de forma precoz y desaparecen en unos meses. El aumento de las concentraciones de las IgG anti-EA, anti-VCA y de las IgA anti-VCA es de gran utilidad para el diagnóstico del CNF ^(14, 26, 27).

La determinación mediante inmunofluorescencia (IF) de las IgA anti-VCA y mediante análisis de inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA) de las IgG anti-EBNA y anti-VCA, que se completa con una exploración endoscópica y clínica, ha permitido diagnosticar 12 casos de CNF entre 929 miembros de familias con cáncer ⁽³²⁾. La carga viral

en el suero de los pacientes (mediante reacción en cadena de la polimerasa [PCR] cuantitativa en tiempo real) es proporcional al volumen tumoral. La concentración de ADN viral sería un buen marcador y una herramienta de seguimiento terapéutico y pronóstico, en comparación con la determinación de los anticuerpos anti-VEB séricos ⁽³³⁾. De forma paralela, en 2004, Wong y cols demostraron que la cantidad de ADN plásmico hipermetilado sería un buen marcador para la detección selectiva y precoz de las recidivas del CNF-TI ⁽³⁴⁾.

b) Factores ambientales

Varios datos epidemiológicos y experimentales sugieren la participación de factores dietéticos en la etiología de los CNF-I. El consumo precoz, sobre todo en la infancia, de pescado seco salado cantonés, rico en nitrosaminas volátiles, que son carcinógenas, es un factor de riesgo demostrado según los estudios de casos y controles realizados en pacientes chinos ⁽³⁵⁾.

Otros factores de riesgo propuestos incluyen fumar cigarrillos, la exposición ocupacional a humos, polvo, formaldehído o radiaciones.

c) Anomalías genéticas

En las zonas de alta incidencia se han descrito varios casos de agregación familiar, lo que sugiere una predisposición genética ⁽³⁶⁾. La pérdida de heterocigosidad que afecta al cromosoma 3, muy frecuente a nivel del epitelio normal de la nasofaringe (74%) y de las lesiones

displásicas (75%), podría constituir una etapa precoz de la tumorigénesis de los CNF en los pacientes chinos ⁽²⁰⁾.

Esta delección 3p se produce en la región 3p21.3, que es la zona del gen RASSF1A que participa en la reparación del ADN y en el control de la proliferación celular dependiente de la vía Ras ^(37, 38).

Se ha propuesto un modelo de transformación maligna multifásico, con la transformación de las células normales del epitelio nasofaríngeo en lesiones preinvasivas y después invasivas ⁽²⁰⁾. En él participarían las delecciones 3p/9p, la infección latente por el VEB, la pérdida de heterocigosidad de varios genes, la inactivación de los genes RASSF1A/p16, así como la desregulación de la telomerasa y la amplificación del gen Bcl 2 ⁽²⁰⁾.

Los estudios realizados a nivel de la región 16q12- 2 sugieren que el gen Rb2/p130 estaría implicado exclusivamente en el CNF del norte de África ⁽³⁸⁾.

Los estudios de ligamiento genético realizados en dos series de familias han demostrado el ligamiento con un locus del cromosoma 4 y un locus 3p21, Feng y cols ⁽³⁶⁾, en un estudio realizado sobre 20 familias.

Los primeros estudios citogenéticos de las líneas celulares del CNF mostraron hipo- o hiperploidia con anomalías cromosómicas posteriores como delección 3p ⁽³⁹⁻⁴¹⁾. Posteriormente, se utilizó el cariotipo para caracterizar las alteraciones cromosómicas en las líneas celulares del CNF ⁽⁴²⁾. Análisis de microsatélites también

revelaron varias regiones con desequilibrios alélicos en tumores primarios ^(43,44). A través de estos estudios, numerosas anomalías genéticas han sido detectadas en múltiples regiones cromosómicas en el CNF y en líneas celulares. Se mapearon varias regiones delecionadas en 3p14.1-22, 11q14.3-22, 14q24.3-32.1 y 16q22-23.

Estudios recientes de hibridación genómica comparada (HGC) han mostrado amplificación de una serie de oncogenes que incluyen MYCL1, TERC, PIK3CA, NRAS y MYB. Ganancias de los cromosomas 1q, 3q, 8q, 11q, 12p, y 12q, y pérdidas en 3p, 9p, 11q, 14q, y 16q. Además, se identificaron mínimas ganancias en 3q27.3-28, 8q21-24 y 11q13.1-13.3, advirtiéndose a ciclina D1 como oncogen sobreexpresado y amplificado en 11q13.3. Hui y cols en un estudio de 26 CNF por técnicas de HGC observaron que en el CNF se produce, frecuentemente, un aumento del número de copias del 11q13, siendo la región 11q13.1-13.3 la más frecuentemente detectada (61.5%) y que además se correlaciona con una amplificación y sobreexpresión del oncogén ciclina D1. Sugieren que la ganancia del 11q13.1-13.3 es importante en el desarrollo del CNF, y que la ciclina D1 es el oncogén diana para la amplificación del 11q13⁽⁴⁵⁾.

Asimismo, se han detectado deleciones de 3p12-14, 8p22, 10p y 18q y amplificación de 3q26, regiones candidatas para la posterior identificación de genes supresores del tumor y oncogenes asociados a CNF ⁽³⁹⁾.

Genes supresores tumorales (GST)

Aunque en el CNF algunas alteraciones de GST bien conocidas (como *TP53*, que codifica la proteína p53; y *RB1*, que codifica la proteína de retinoblastoma) son relativamente raras (pero más comunes en las líneas celulares), se han observado múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas anómalas en otros genes supresores.

La **Tabla 4** resume las alteraciones genéticas más comunes detectadas en el CNF.

P53 es un supresor tumoral que induce la detención del ciclo celular en respuesta al daño del ADN. En los cánceres de cabeza y cuello los niveles bajos de p53 son debidos a mutaciones y éstas han sido relacionadas con un mayor riesgo de recidiva locorregional después de radioterapia y peor respuesta a quimioterapia. Sin embargo la historia natural del CNF es distinta, las células tumorales sobreexpresan p53 y las mutaciones del mismo son relativamente raras en el CNF.

La razón de la sobreexpresión de p53 en el CNF no está clara y el conocimiento de su valor pronóstico es limitado y no se ha encontrado correlación consistente entre la mutación de p53 y el estadio de la enfermedad y/o supervivencia.

Análisis de microsatélites han mostrado una pérdida de heterocigosidad en el cromosoma 9p (61-85%) en el CNF ⁽⁴⁶⁾. La región más comúnmente afectada es 9p21.3, que está delecionada en un 85-95% de los tumores invasivos. Los GST localizados en esta región son los inhibidores de las cinasas dependientes de ciclina (CDK) p16, p15 y p14ARF ^(44, 47, 48). Las proteínas p15 y p16 son importantes en la regulación del ciclo celular ya que inhiben el paso de la fase G1 a la S.

Tabla 4. Alteraciones genéticas detectadas por análisis de marcadores de microsatélite e hibridación genómica comparada en líneas celulares de CNF y tumores primarios
⁽³⁹⁾

Cromosoma	Delecciones	Amplificaciones
1	1p36, 1p34	1q24.3-32.1, 1q42-44
2	2p12	2q24-31
3	3p25.3-26.3, 3p22-21.3, 3p14-12	3q26, 3q27.3-28
4	4q28	4q12-21
5	5q11-14, 5q31-33	5q21
6		6q14-22
7	7q31.3-36	7p15-14, 7q11.2-21
8		8q21.1-22,8q23-24
9	9p21-23, 9q22.33-q31.2	
10	10p	
11	11q13-14, 11q14-23	11p15, 11q13.1-13.3
12		12p12-13, 12q13-15, 12q22-24.1
13	13q12-14.3, 13q21-32	
14	14q11-13, 14q24-31	
16	16q21, 16q22.3-23.1, 16q24.1	
17	17p13.3, 17q11	17q21, 17q25
18	18p11.21, 18q23	18q12-22

La inactivación de estos genes lleva a una fosforilación de la proteína Rb y por tanto a una pérdida del factor de transcripción E2F. Esto estimula a la célula a entrar en la fase S e iniciar una proliferación celular descontrolada ^(49, 50). En el CNF se ha observado una deleción homocigota de ambos genes p15 y p16 en aproximadamente el 40% de los tumores primarios ^(46, 51). Además, se ha detectado (22-46%) una hipermetilación en la p16 pero no en la p15 ^(47, 48). Más aún, en la mayoría de los tumores primarios se ha detectado una pérdida de la proteína p16 ⁽⁵²⁾. Esto hace sospechar que esta proteína es la mejor diana para inactivar en este tumor ⁽⁴⁶⁾.

P16 es una proteína quinasa inhibitoria ciclin-dependiente (CKI) que está frecuentemente inactiva en el cáncer. La función normal de p16 es suprimir a la cdk4, una proteína que controla el paso G1/S a través de la regulación negativa de la actividad de la ciclina D1 y rompe el complejo ciclina D1/CDK-4/6. La pérdida de la p16 supone una superestimulación de la ciclina D1 y un aumento en las transiciones de la fase G1/S ⁽⁵³⁻⁵⁶⁾.

Tradicionalmente la transcripción de la p16 está mediada por la proteína del retinoblastoma (pRb); la inactivación de la pRb lleva a unos niveles bajos de p16. Deleciones, mutaciones o metilaciones del gen p16 se han implicado en el desarrollo de numerosos tumores incluyendo tumores de cabeza y cuello ⁽⁵⁷⁾. La mayoría de los cánceres de cabeza y cuello muestran unos niveles bajos de p16 con niveles altos de pRb. En los carcinomas escamosos de cabeza y

cuello el mecanismo más común de inactivación de p16 es la delección homocigota del gen seguida de una hipermetilación del mismo. Las líneas celulares del CNF tienen bajo niveles de p16 secundario a la hipermetilación de p16, pero esta alteración epigenética puede estar mediada por la formación de un heterodímero c-Jun/JunB inducido por LMP1 que produce la activación de ADN metiltransferasa. Adicionalmente, LMP1 desactiva la p16 por inducir la acumulación citoplásmica de E2F4/5 y Ets2, que son proteínas necesarias para la actividad normal de la p16⁽⁵³⁾.

Aproximadamente 2/3 de los CNFs presentan niveles bajos de p16, describiéndose pérdida de la expresión de p16 en un 40% a 70% de CNF no tratados^(58, 59), lo que sugiere que la inhibición de la p16 no es crítica para el desarrollo del CNF. Sin embargo, la ausencia de p16 es importante. Pacientes con CNF con bajos niveles de p16 tienen un peor pronóstico debido a que está asociado con un radiosensibilidad disminuída y a un alto riesgo de sufrir recurrencias. La ausencia de expresión de p16 en CNF que recidivaron tras tratamiento (96%) es significativamente mayor que en los CNF primarios no tratados (40 a 70%)⁽⁵⁷⁾. La razón de esto puede ser que la radiosensibilidad en las células está relacionada con la síntesis de ADN y la pérdida de p16 aumenta el número de células en fase S. La alta proporción de CNF recidivante con pérdida de actividad de p16 sugiere que esta pérdida puede conferir una ventaja para la

supervivencia de las células tumorales, haciéndolas más resistentes que sus homólogas p16 positivas al tratamiento convencional con radioterapia+/-quimioterapia. Otros autores han descrito una asociación entre la pérdida de p16 y un pronóstico peor. Hwang y cols.⁽⁵⁸⁾ describieron una correlación estadísticamente significativa ($p=0.047$) entre la ausencia de p16 y una alta tasa de recurrencia local en CNF. En otro estudio realizado sobre 84 muestras, Makitie y cols.⁽⁵⁹⁾ encontraron una asociación estadísticamente significativa ($p=0.022$) entre la ausencia de p16 y una menor tasa de supervivencia. Estos hallazgos podrían sugerir que la pérdida de las proteínas supresora p16 en CNF les confiere resistencia a la radioterapia y puede estar asociada a la alta tasa de recidiva después del tratamiento. Por tanto, la expresión de p16 parece ser un marcador pronóstico útil en el CNF, y la vía de la p16 una diana terapéutica y mejorar el tratamiento y pronóstico del CNF.

La función supresora del gen p16/INK4A se ha demostrado reiteradamente en múltiples líneas celulares del CNF. La presencia de p16 exógena en la línea celular del CNF p16-null, HK1, induce una supresión del paro G0/G1 significativamente^(60, 61). Estudios recientes han demostrado que la p16 puede servir para modular la respuesta celular a drogas quimioterápicas (por ej. Cisplatino y 5-fluouracilo) en el CNF⁽⁶¹⁾.

La delección del cromosoma 3p es la alteración genética encontrada con mayor frecuencia en el CNF. La detección de esta

anomalía en lesiones precancerosas y en el epitelio normal sugieren que la inactivación de los genes supresores localizados en 3p es uno de los eventos primeros que ocurren en el CNF.

La región del cromosoma que está afectada es la 3p21.3. y los genes involucrados son RASSF1A, BLU/ZMYND10, y CACNA2D2 ^(37, 62), observándose que son defectuosos como resultado tanto de una metilación, o deleciones y mutaciones o ambas.

Una expresión ectópica de p16, RASSF1a o BLU/ZMYND10 en líneas celulares del CNF provocan una inhibición significativa del crecimiento celular, formación de colonias o crecimiento tumoral en animales inmunodeficientes, proveyendo de una evidencia fuerte de que estos genes funcionan como supresores tumorales en el CNF^(63,64).

Estudios exhaustivos epigenéticos han demostrado que otros GST estaban silenciados, por alteraciones epigenéticas, en el CNF. Indicando que la patogénesis molecular del CNF es mucho más compleja ⁽³⁹⁾.

Regulación del ciclo celular

Como en todos los cánceres, el desarrollo del CNF requiere de la alteración del ciclo celular normal (**Fig. 4**).

La ciclina D1 es una proteína reguladora del paso de la fase G1 a la S del ciclo celular. Ésta se activa y forma un complejo con cdk4 o cdk6 y éste es el responsable de la inactivación, debido a su

fosforilación, de la proteína supresora del retinoblastoma; resultando en una liberación de los factores de transcripción E2F que son los que permiten a la célula entrar en la fase S ^(50,65,66,67). La actividad normal de la ciclina D1 está regulada por la p16, su desunión del complejo por la p16 lleva a su degradación y terminación de la fase G1 ⁽⁶⁸⁾. La sobreexpresión de la ciclina D1 favorece a las células con daño celular a estancarse en el punto G1/S del ciclo celular ⁽⁶⁹⁾. Se ha descrito una amplificación de la Ciclina D1 y una expresión alterada de la proteína en una amplia variedad de tumores que incluyen esófago, colon, mama, pulmón y cabeza y cuello ^(70,71)

La ciclina D1 se encuentra sobreexpresada en el CNF. Los mecanismos subyacentes incluyen la actividad de las proteínas Ras y Raf y, más importante, los niveles bajos de p16. Además, LMP-1 induce una acumulación intranuclear de EGFR que puede directamente activar la transcripción de la ciclina D1 ^(53, 72,73).

El grado de sobreexpresión en el CNF es comparable al de otros carcinomas de cabeza y cuello —por ejemplo, 66% en CNF vs 64% en carcinoma escamoso de cabeza y cuello—, describiéndose sobreexpresión de ciclina D1 de un 30%⁽⁷⁴⁾ hasta un 66%⁽⁵⁸⁾ de los CNF primarios no tratados. Otro estudio evidenció sobreexpresión de ciclina D1 (26%) en tumores recidivados similar a la de los primarios no tratados⁽⁵⁷⁾. Varios investigadores han descrito una asociación entre la sobreexpresión del proto-oncogen y un peor pronóstico en términos de menor supervivencia y un aumento de recidivas de CNF.

Este peor pronóstico parece ser independiente de otros parámetros clínico-patológicos tales como estadio tumoral, metástasis ganglionares o a distancia o grado de diferenciación^(75, 76). Otros estudios, sin embargo, han fracasado en demostrar esta asociación ó han encontrado una relación inversa. Altos niveles de ciclina D1 en CNF se correlacionan con una respuesta aumentada del tumor a la radioterapia y una tasa menor de recidivas locales⁽⁷⁷⁾. Esto puede ser debido a que la ciclina D1 afecta al número de células que se encuentran en la fase de transición G1/S y la radiosensibilidad es proporcional a la síntesis de ADN.

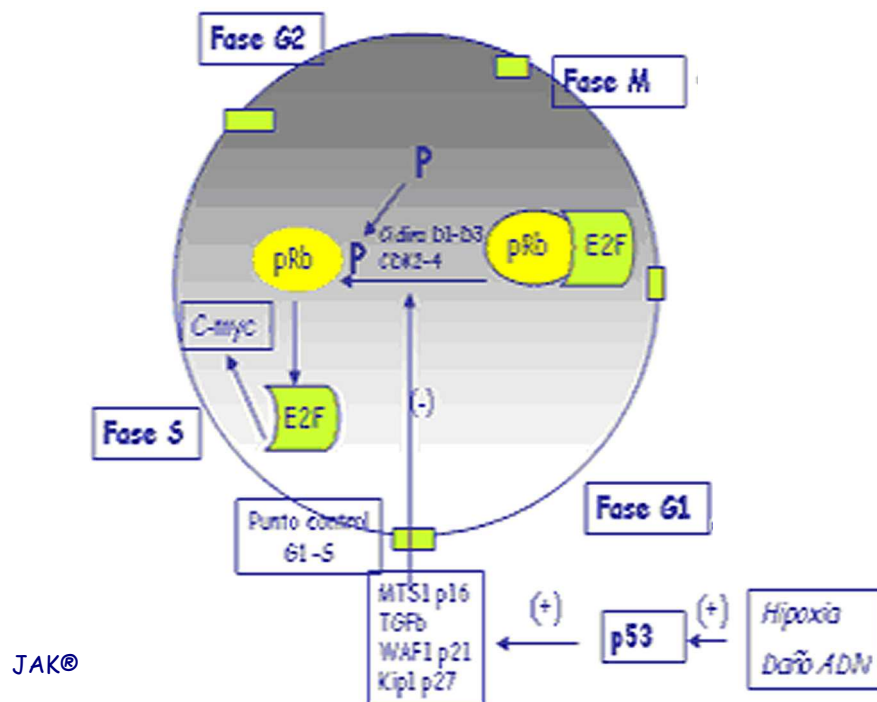


Figura 4.- Esquema del ciclo celular.

Los altos niveles de ciclina D1 pueden ser la razón molecular que está por detrás de la sensibilidad única del CNF a la radiación y quimioterapia. Sin embargo, los efectos exactos que tienen los niveles elevados de ciclina D1 en el CNF no son del todo conocidos y se deben realizar investigaciones que determinen cómo la regulación de la ciclina D1 puede influir en la terapéutica del tumor.

En este sentido, varios investigadores sugieren que la inactivación de p16 y la amplificación de CCND1 pueden ser importantes en la alteración en el ciclo celular y desarrollo del CNF. Por tanto, la ciclina D1 puede ser una diana importante para el desarrollo de más estrategias terapéuticas para el CNF ⁽⁴⁵⁾.

Oncogenes

Se han identificado, en diversos estudios, amplificaciones específicas en el CNF que han implicado varios oncogenes. Éstos incluyen BCL2, CCND1, EGFR, EV11, HER2/ERBB2, HRAS, NRAS, MDM2, MYC y PIK3CA; que pueden mostrar amplificación, sobreexpresión, o mutaciones. Estudios de HGC (Hibridación Genómica Comparada) han demostrado la existencia de sobreexpresión y ganancia en el número de copias del gen c-myc localizado en 8q24 y del gen del EGFR que se localiza en 7p12, sugiriendo que estos genes pueden ser dianas para la activación ^(46,78,79).

El EGFR es un receptor transmembrana glicoproteico de 170 kD con una actividad tirosin-quinasa intrínseca que regula el crecimiento celular. Los receptores del factor del crecimiento con actividad tirosin-quinasa regulan fundamentalmente, el comportamiento celular, incluyendo supervivencia celular, diferenciación, motilidad y proliferación. La familia de de los receptores del factor de crecimiento tipo I está compuesta por el EGFR, HER-2/neu (c-erbB2), HER-3 (c-erbB3), y HER-4 (c-erbB4). Estor receptores constan de un dominio extracelular rico en cisteína, una región simple transmembrana y una cola citoplasmica que contiene actividad tirosin-quinasa y varios residuos de tirosina que son fosforilados en uniones ligandos. El resultado es una señal de transducción a lo largo de múltiples vías que llevan a la proliferación celular y otros eventos que pueden afectar a la progresión tumoral (**Fig. 5**). Estos receptores y sus ligandos han sido implicados en la génesis de numerosos carcinomas humanos^(80,81)

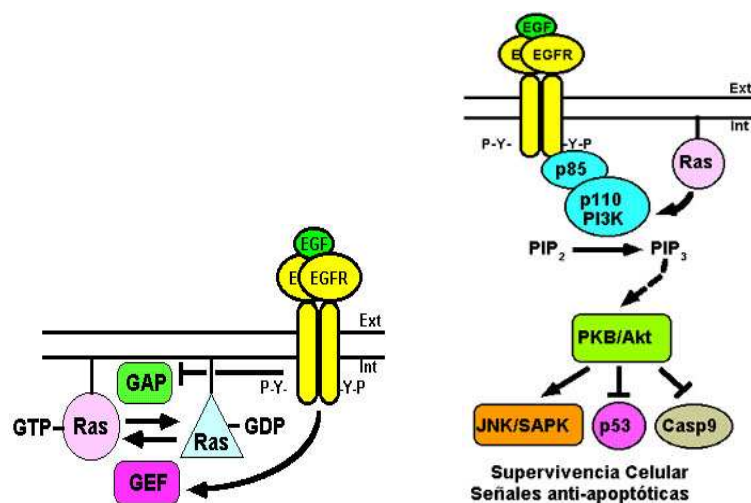


Figura 5.- Rutas de señalización del EGFR.

La sobreexpresión de EGFR se ha demostrado en una amplia variedad de tumores que incluyen pulmón, próstata, y mama. En estos tumores, la sobreexpresión o mutación del gen del EGFR causa una estimulación de la cascada que lleva a una proliferación celular descontrolada ⁽⁵³⁾. También está sobreexpresado en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y se correlaciona con el tamaño tumoral y estadio ⁽⁸⁰⁾. Sin embargo, la sobreexpresión del EGFR ha sido demostrada tan sólo en la mitad de los CNF ⁽⁸²⁾. Datos de otras líneas celulares han demostrado que los factores de crecimiento epiteliales promueven la supervivencia celular en aquellos que sobreexpresaban EGFR, y otros han demostrado que la inhibición de EGFR lleva a la apoptosis ^(83, 84). También se ha visto que los factores de crecimiento epiteliales y EGFR juegan un papel importante en la angiogenesis tumoral, que es importante para el crecimiento tumoral, supervivencia y metástasis ⁽⁸⁵⁾.

El papel de la expresión del EGFR en CNF es aún desconocido. La supresión de la señal de EGFR no inhibe el crecimiento del CNF, sugiriendo que otra vía de proliferación como la de Wnt puede jugar un papel muy importante en el crecimiento celular en el CNF. Asimismo, se ha observado coexpresión de la proteína latente de membrana codificada por EBV y EGFR en los CNF ⁽⁸⁶⁾. El VEB ejerce un único efecto sobre el EGFR: LMP1 causa endocitosis y acumulación nuclear del EGFR. El EGFR intranuclear actúa como un

factor de transcripción que aumenta la proliferación celular, y el EGFR citoplásmico se une a la ciclina D1 y ciclina E para acelerar la transición G1/S. Por lo tanto, parece que el EGFR tiene un papel más importante como un factor de transcripción que como una señal proliferativa en el CNF ⁽⁵³⁾.

Por otra parte, se ha observado que el EGFR es un factor predictor de una peor evolución clínica en CNF indiferenciados en la población china. Estos resultados podrían contribuir a entender el papel de los marcadores biológicos e identificar a pacientes con peor pronóstico que se podrían beneficiar de un tratamiento más agresivo o con terapia molecular como anticuerpos monoclonales ⁽⁸⁷⁾.

Aunque se ha visto sobreexpresión de las proteínas bcl-2, ciclina D1, ras y c-met en los tumores primarios, no se han encontrado cambios estructurales en estos genes ^(88,89). Sin embargo, estudios posteriores han demostrado para alguno de estos genes, como el CCND1 que codifica ciclina D1, su potencial oncogénico en células del CNF ⁽⁵⁷⁾.

d) Tipo HLA (antígeno leucocitario humano)

Los estudios de casos y controles realizados sobre los antígenos de clases I y II del sistema HLA han demostrado la existencia de varios marcadores de susceptibilidad para el CNF ^(90, 91, 92). No obstante, los alelos son diferentes entre Extremo Oriente (A2, B46,

DRB1*03) y el norte de África (B13, A23, DRB1*05). Esta variación indica la existencia de genes recesivos que presentan un ligamiento con la región HLA y que tienen un papel determinante en el riesgo de CNF.

3. Morfología del CNF

a) Generalidades de la Nasofaringe

La nasofaringe (cavum, rinofaringe o epifaringe) es una cavidad aérea de forma cúbica, que constituye la parte superior retronasal de la faringe, situada por detrás de las fosas nasales, bajo la base del cráneo y por encima de la orofaringe (**Fig. 6**). Se trata de una estructura de difícil acceso a la visión directa. La cara superior, o techo del cavum, está constituida por una mucosa que reviste la apófisis basal del occipital, la parte adyacente del cuerpo del esfenoides y el ligamento atlantooccipital anterior. La pared posterior consta del clivus y de las dos primeras vértebras cervicales. Las paredes laterales son sobre todo de tipo musculoapneurótico, y en la parte anterior, a nivel de la cara medial de la apófisis pterigoides sólo están formadas por aponeurosis ^(93, 94, 95).

La nasofaringe se relaciona en su parte anterior con:

- las fosas nasales y las coanas;
- los senos maxilares, el etmoides y el fondo de las cavidades orbitarias.

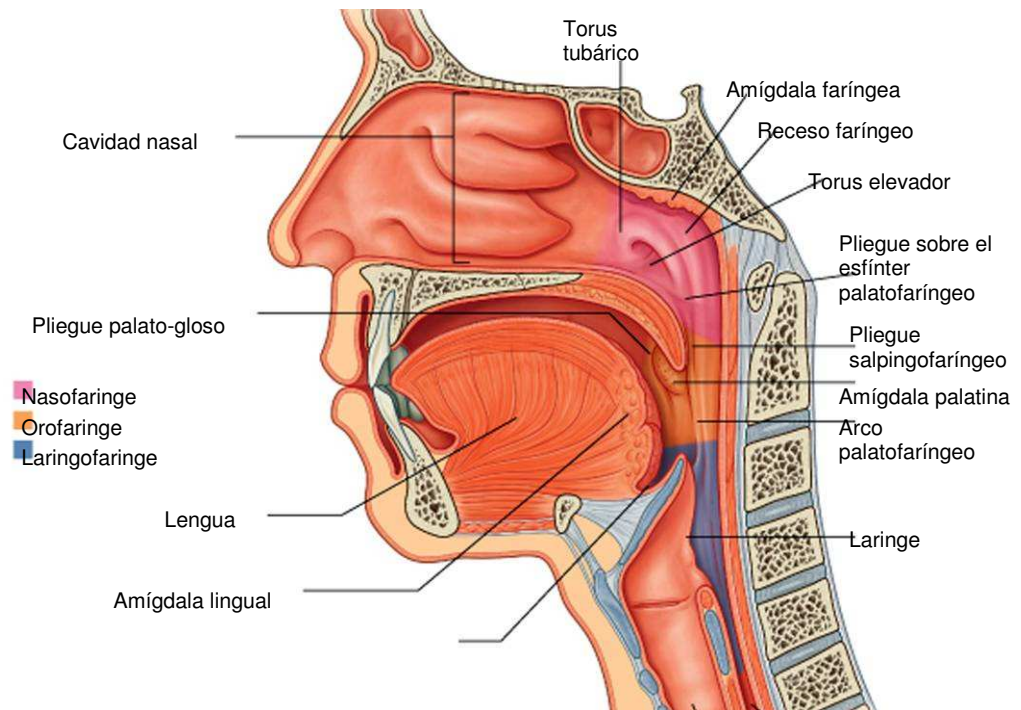


Figura 6.- Localización anatómica de la nasofaringe.

Las relaciones posterosuperiores se establecen con la base del cráneo:

- el cuerpo del esfenoides;
- la apófisis basal del occipital y el cuerpo de las dos primeras vértebras cervicales;
- a través del esfenoides y del occipital, con la fosa craneal inedia, el seno cavernoso y los nervios craneales (V y VII), la fosa cerebelosa, el tronco del encéfalo y los pares X y XI (agujero yugular) y XII (agujero condíleo anterior).

La nasofaringe se comunica en sus partes laterales con:

- la trompa de Eustaquio y la fosita de Rosenmüller;
- el espacio parafaríngeo, que es la zona de paso del eje carotidoyugular, los nervios mixtos y el simpático cervical.

En su parte inferior, se relaciona con el velo del paladar y con los pilares de la amígdala. En la parte anterior, la nasofaringe se comunica con las cavidades nasales a través de las coanas.

El drenaje linfático de la nasofaringe se realiza hacia los ganglios retrofaríngeos, que son inaccesibles a la exploración clínica, pero pueden detectarse mediante un estudio con tomografía computarizada (TC) o con resonancia magnética (RM), yugulocarotídeos altos, espinales altos y supraclaviculares.

La mucosa nasofaríngea está formada esencialmente por un epitelio de superficie cuya estructura es variada y que se apoya en una membrana basal, así como por un corion con más o menos abundancia de folículos linfoides.

La nasofaringe consta de dos tipos de epitelio: plano estratificado no queratinizado, pseudoestratificado ciliado de tipo respiratorio y una zona intermedia de transición de epitelio.

El corion está compuesto por glándulas salivales accesorias en racimo, formadas por acinos de tipo mucoso y seroso, así como por folículos linfoides de centro germinativo agrupados a nivel de la amígdala faríngea de Luschka. También se encuentra un infiltrado inflamatorio difuso compuesto de linfocitos, plasmocitos y células de

tipo histiocito-macrófago, dispersas por la mucosa y que a veces infiltran el epitelio de superficie.

Los carcinomas suelen originarse a nivel de la fosita de Rosenmüller, en la cavidad rinofaríngea. El tumor se desarrolla en el punto donde la mucosa epitelial se apoya directamente en el tejido linfoide. Las células tumorales son de origen epitelial, y presentan una relación más o menos íntima con los elementos linfoides.

b) Clasificación de los CNF

§ **La clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud (OMS)** es la más utilizada y se basa en el grado de diferenciación morfológica de las células epiteliales y en la presencia o no de puentes intercelulares y de queratina ^(14, 15, 16). En la clasificación de 1978, se reconocen tres subtipos histológicos:

- **Carcinoma de células escamosas, o tipo 1 de la OMS** son infrecuentes en las zonas de endemia (<5-10%) y más habituales en los países occidentales (30-40%), que son zonas de baja incidencia. Este tipo se caracteriza por una diferenciación epidermoide evidente, con puentes intercelulares y depósitos de queratina de aspecto perlado.
- **Carcinoma no queratinizante, o tipo 2 de la OMS** representan el 15-20% de los casos. La diferenciación

epidermoide no es evidente. Las células tumorales presentan una disposición estratificada no sincitial, presentando contornos regulares y netos, con un aspecto pavimentoso y ausencia de secreción de mucina o de diferenciación celular.

- Carcinoma **indiferenciado (CNFTI)**, o **tipo 3 de la OMS** son los más frecuentes en las zonas de endemia. La proliferación es linfoepitelial y consta de células que se disponen en masas más o menos regulares con núcleos redondeados u ovalados, vesiculosos, con un nucléolo prominente. Los límites celulares son indistintos y el tumor aparece en forma sincitial. Existen numerosos elementos linfoides no neoplásicos en el seno de estos CNFTI. La relación con el VEB puede comprobarse con procedimientos de inmunohistoquímica mediante la demostración de la LMP o con técnicas de hibridación *in situ*.

En la clasificación de 1991, el subtipo carcinoma de de células escamosas (queratinizante) se mantiene, mientras que los dos subtipos restantes se engloban bajo una sola categoría de “carcinoma no-queratinizante”, que fue posteriormente subdividida en “diferenciado” y “no diferenciado”.

La actual clasificación mantiene la terminología de la clasificación de 1991, con la adición de una categoría: carcinoma de células escamosas basaloide.

§ **La clasificación de Micheau**, cuyo uso está muy difundido, individualiza dos tipos:

Carcinoma bien diferenciado.

Carcinoma indiferenciado o pobremente diferenciado.

La frecuencia de los distintos tipos histológicos varía en función de la edad y de las regiones geográficas (**Tabla I**) (pág.27). Los carcinomas diferenciados de tipo 1 de la OMS son más frecuentes en los pacientes ancianos y en las zonas de baja incidencia, mientras que los indiferenciados son más comunes en las zonas de incidencia intermedia o alta. La forma sarcomatosa puede plantear problemas de diagnóstico diferencial con los linfomas de alto grado, sobre todo en los niños, por lo que es útil emplear técnicas de inmunohistoquímica. Las células tumorales muestran una reactividad constante con el anticuerpo anticitoqueratina y con el antígeno de membrana epitelial (EMA).

c) Extensión tumoral

La extensión puede dirigirse en sentido anterior hacia las fosas nasales, en sentido inferior hacia la orofaringe, así como en sentido superior hacia el esfenoides y el seno esfenoidal. Las zonas de baja resistencia a la invasión son la región parafaríngea, que se afecta en más del 70% de los casos, la trompa de Eustaquio, las coanas y las

fosas nasales, la orofaringe, así como la región paralela. Las zonas de mayor resistencia a la extensión tumoral son la base del cráneo, las apófisis pterigoides, la órbita y las estructuras óseas nasosinusales. Los CNF se difunden con rapidez a los ganglios regionales, lo que constituye la forma predominante de manifestación. Las adenopatías cervicales se afectan en más del 60% de los casos, y la primera estación de relevo es el grupo retrofaríngeo, que puede detectarse en la TC y que, en teoría, es palpable mediante un tacto endobucal. La afectación de los ganglios supraclaviculares se asocia a un peor pronóstico ^(17, 18). El diagnóstico suele ser fácil ante la asociación de signos otorrinológicos y de adenopatías cervicales. Las metástasis a distancia, que son excepcionales en el momento del diagnóstico, representan la circunstancia más frecuente de fracaso terapéutico y suelen aparecer en el esqueleto axial o, en menos casos, a nivel hepático o pulmonar ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾.

4. Diagnóstico del CNF

a) Signos clínicos

n Adenopatías cervicales

Se trata del principal signo de presentación, que se observa en más del 50% de los casos. Consiste en la aparición de una o más adenopatías, uni o bilaterales, en la mayoría de los casos altas y posteriores, subdigástricas, yugulocarotídeas, espinales posteriores o, en menos casos, supraclaviculares ^(14, 16, 17, 19, 22, 96).

n Signos otológicos

Están presentes en el 40-60% de los casos, a menudo de forma unilateral y se manifiestan como:

- § hipoacusia de transmisión relacionada con una otitis seromucosa;
- § acúfenos uni o bilaterales, o en menos casos como otalgia u otorrea.

n Signos rinológicos

Forman parte de la tríada sintomática y consisten en:

- § obstrucción nasal uni o bilateral;
- § epistaxis repetidas evidentes o al sonarse;
- § exudado nasal persistente, a veces sanguinolento, que no mejora con las medidas terapéuticas.

n Afectación de los nervios craneales

Es menos frecuente (10-20% de los casos) e indica una invasión de la base del cráneo, con un valor localizador preciso. Por orden de frecuencia, se puede observar:

- § una diplopía por afectación del VI (recto lateral);
- § algias hemifaciales o faríngeas por afectación del V o del IX;
- § cefalea o hemicránea relacionadas con una extensión endocraneal.

n Signos oftalmológicos

La afectación oculoorbitaria es infrecuente, y en la mayoría de las ocasiones se trata de un exoftalmos o de una parálisis oculomotora; se observa en el 5% de los casos ⁽⁹⁷⁾.

b) Exploración física

n Rinoscopia

En las zonas de incidencia alta (sudeste asiático) o media (Magreb), cualquier adenopatía alta asociada o no a síntomas otológicos o rinológicos, obliga a realizar una exploración clínica centrada en la nasofaringe ^(14, 16, 45). El procedimiento principal es la exploración mediante nasofibroendoscopio, que permite una visión mejor que la rinoscopia posterior. La lesión suele ser lateral o posterosuperior, de aspecto sobre todo excrecente o infiltrante. Esta etapa fundamental permite visualizar el tumor, precisar su tamaño, su extensión y realizar la biopsia diagnóstica con una pinza.

La rinoscopia posterior con espejo es difícil de realizar, sobre todo en los niños pequeños o en los pacientes con un reflejo nauseoso intenso o con trismus marcado. La visión de la nasofaringe suele ser incompleta y la realización de biopsias es complicada y más difícil que mediante nasofibroendoscopia.

En los pacientes difíciles de explorar, la visualización del cavum mediante nasofibroendoscopia o rinoscopia posterior se realiza bajo anestesia general.

n Exploración otoscópica

Debe ser sistemática. Puede ser normal, en caso de tumor localizado del techo, o bien permite sospechar el diagnóstico en los casos típicos donde se evidencia un aspecto de otitis serosa.

n Audiometría

No suele realizarse de forma habitual, y demuestra una hipoacusia de transmisión. El diagnóstico de otitis serosa se establecerá por el patrón plano o cupuliforme del timpanograma.

n Exploración de la orofaringe

Se dirige a buscar una extensión hacia la pared posterior de la faringe o los signos de afectación de los nervios mixtos (signo del telón y ausencia del reflejo nauseoso). Se debe apreciar el estado dental, para evaluar los cuidados y las extracciones necesarias antes de la radioterapia.

n Exploración de las áreas ganglionares cervicales

Se concentra sobre todo en la región cervicofacial, donde se localizan las adenopatías en más del 75% de los casos^(17, 19). Suelen ser voluminosas (>3 cm) en más del 60% de las ocasiones^(19, 20, 96). La presencia de una infiltración o de una permeación cutánea sugiere una forma evolucionada de la enfermedad. Debe realizarse un esquema preciso en el que se representarán su tamaño, que se

medirá con una regla o un calibre, su localización, su número, así como su lateralidad ^(17, 18, 19). El tamaño y la localización de las adenopatías son los elementos clave de la clasificación del grado N del sistema TNM.

n Exploración de los pares craneales

Se afectan en el 10-15% de los casos y deben explorarse de forma sistemática. Pueden observarse varios síndromes semiológicos neurológicos, que indican de forma directa una afectación anatómica precisa ^(14, 15, 96).

n Valoración del estado general y búsqueda de los síntomas de metástasis

La última fase de la exploración clínica es, por una parte, la evaluación del estado general del paciente según el índice de Karnofsky o de la OMS y, por otra, mediante la búsqueda de los síntomas sugestivos de metástasis (presentes en el diagnóstico en menos del 10% de los casos), sobre todo óseas, por la presencia de dolor o tumefacción. En menos ocasiones son de tipo hepático, con hepatomegalia o ictericia, o pulmonares, con dolor torácico o disnea ^(17,19,96).

La presencia de fiebre, de una reacción leucemoide, de acropaquias (hipocratismo digital), de dermatomiositis o de un síndrome de Pierre Marie debe hacer sospechar la asociación con un

síndrome paraneoplásico, que aparece en menos del 5% de los casos de CNF ^(98, 99).

c) Estudios complementarios

n Métodos de imagen

• Tomografía computarizada (TC)

En la evaluación del volumen tumoral y de la extensión locorregional, la TC sigue siendo la prueba que debe realizarse en primer lugar, pues su rendimiento permite apreciar el volumen tumoral y las extensiones locorregionales para definir el grado T de la clasificación TNM del tumor nasofaríngeo y la afectación ganglionar asociada, cervical o retrofaríngea ⁽¹⁰⁰⁾. Debe incluir cortes axiales y coronales, que vayan desde el vértice del cráneo hasta las fosas supraclaviculares, en ventanas óseas y de tejidos blandos. Los equipos de TC multicorte permiten en la actualidad adquisiciones volumétricas en cortes ultrafinos y reconstrucciones en los distintos planos, así como la obtención de imágenes tridimensionales. El estudio mediante TC es útil para el análisis fino del hueso cortical y detecta de forma precoz la extensión ósea a la base del cráneo. La TC, permite:

§ demostrar las extensiones laterales hacia la fosa pterigomaxilar, la apófisis pterigoides y el relieve tubárico;

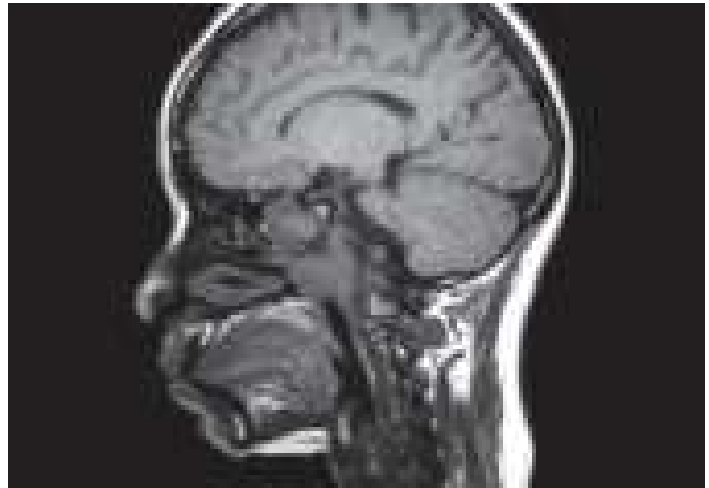
- § objetivar la extensión superior hacia la base del cráneo y al endocráneo;
- § mostrar la presencia de adenopatías retrofaríngeas, que constituyen la primera estación de drenaje, y de ganglios cervicales;
- § precisar el grado T (T1 a T4) del sistema TNM.

• **Resonancia magnética (RM) (Fig. 7)**

Debido a que su resolución presenta un contraste muy elevado, la RM es superior a la TC para apreciar la extensión en profundidad de los procesos mucosos iniciales en estadios T1 y T2a, la extensión hacia la base del cráneo y la afectación de los nervios craneales, así como las extensiones perineurales. La RM es mejor que la TC para analizar los aspectos tras el tratamiento, en especial después de la radioterapia, al ayudar a diferenciar un aspecto de fibrosis secundaria frente a una recidiva local ^(100,101). La RM sigue siendo la técnica que debe realizarse si existen signos neurológicos, en especial para la exploración del agujero yugular, así como para la localización de las lesiones en caso de afectación de los pares craneales. El estudio consta de los planos axial, coronal y sagital, y se realiza con y sin inyección de gadolinio. La RM permite demostrar mejor, a partir de las secuencias potenciadas en T1/T2, en eco de espín, las extensiones hacia la base del cráneo, el endocráneo y la fosa posterior ⁽¹⁰¹⁾.

Figura 7^(*)(117).-

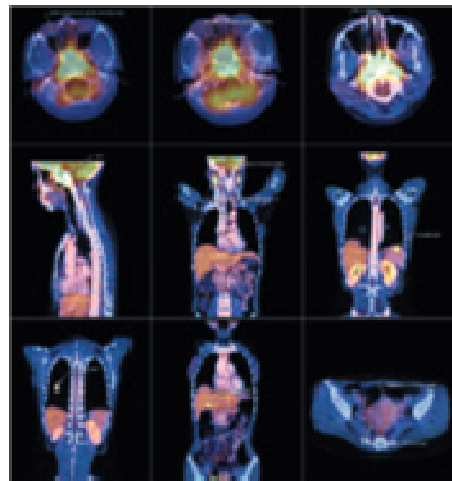
A) Imagen de Resonancia Nuclear Magnética (RM) de un CNF.



B) Imagen de RM de un CNF.



C) Imagen de una Tomografía con Emisión de Positrones en combinación con Tomografía Computarizada (PET)-TC



(*): Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours, Lyon 2005.

n **Estudio de extensión**

La radiografía de tórax, la ecografía abdominal y la gammagrafía ósea siguen siendo exploraciones clave en el estudio de extensión de un CNF, con una sensibilidad/especificidad del 100/100% para la radiografía torácica, del 66,7/86,8% para la gammagrafía ósea y del 50/99,3% para la ecografía abdominal, que se incrementan en función del T y del N ^(14, 15, 102). La PET tendrá un papel cada vez más predominante en la evaluación de la enfermedad locorregional, pero sobre todo, en esta enfermedad altamente evolutiva, para la detección de la enfermedad metastásica. La sensibilidad/ especificidad de la PET es del 100/90,1%, con unos valores predictivos positivo/negativo del 63,6/100% ⁽¹⁰³⁾.

n **Serología viral**

La serología anti-VEB se ha estudiado de forma amplia en los pacientes con CNF. Se ha encontrado un perfil sugerente cuando aparece una concentración elevada de anticuerpos anti-VEB IgA de tipo EA y VCA. Distintos estudios han demostrado que las IgA anti-VCA y anti-EA son útiles, de forma que el aumento específico de las proliferaciones de tipo epitelial presenta un valor predictivo del orden de 6 meses a un año (**Tabla 3**) (pag. 32). El estudio chino de Mai y cols describe una sensibilidad de 0,84 del marcador viral en el plasma/suero ⁽¹⁰⁴⁾.

n Marcadores tumorales

El marcador Cyfra 21, que se ha estudiado en paciente chinos y en Túnez, parece ser uno de los marcadores séricos más prometedores, con una sensibilidad superior al 80% ⁽¹⁰⁵⁾.

La determinación de la carga viral sérica mediante PCR de la región Bam H1-W también es un método útil, con unas concentraciones que se correlacionan con la evolución clínica ⁽¹⁰⁶⁾. La fracción libre del ADN viral plasmático constituye en la actualidad el marcador más sensible (96%) y más específico (93%) en los pacientes con CNF, de cara al diagnóstico y el seguimiento postterapéutico ⁽¹⁰⁶⁾.

5. Clasificación anatomoclínica del CNF

Existen varias clasificaciones. La más utilizada es la de la AJC/UICC, que ha sufrido varias modificaciones, comenzando en 1997 (**Tabla 5**). En la actualidad se dispone de los primeros análisis críticos de la versión de 1997 ⁽¹⁰⁷⁾, que han llevado a una versión más reciente, propuesta en 2002 ⁽¹⁰⁸⁾. Estas últimas versiones parecen superiores a las de Ho (1978) y de la AJC (1987), con una mejor definición de los grupos pronósticos, tanto para el grado T como para el N. La afectación orbitaria y la de los nervios craneales, o la extensión endocraneal (T4) se asocian a un mal pronóstico ⁽¹⁰⁷⁾.

6. Formas clínicas del CNF

a) Infantil

Son frecuentes (hasta el 10% de los casos) en los países del Magreb, lo que explica la distribución bimodal en estas naciones, así como el pico de incidencia entre los 15 y los 25 años ^(14, 15, 22). Antes de los 15 años, el CNF es especialmente evolutivo, con formas de un gran volumen ganglionar más que nasofaríngeo, así como una incidencia elevada de síndromes paraneoplásicos (acropaquias, fiebre, osteoartropatía hipertrofiante neúmica). La edad de aparición conlleva el problema de las secuelas a largo plazo de la quimio y radioterapia ^(14, 17, 22).

b) Adulto

Son más frecuentes en los países occidentales, donde el promedio de edad de aparición de los CNF es del orden de 55 años. El tipo histológico 1 de la OMS (bien diferenciado) es el predominante, con una afectación nasofaríngea a menudo más voluminosa que la de los ganglios cervicales ^(14, 21).

c) Localizada

Los tumores T1-T3/N0 podrían ser más frecuentes en caso de que se siguiera una política de detección precoz o de detección selectiva en las zonas de endemia de CNF. Aún representan menos

del 10% de los CNF y tienen una supervivencia global y libre de enfermedad superiores a las formas de alto riesgo, con un esquema terapéutico que podría recurrir sólo a la radioterapia ^(14, 15, 21). Las formas submucosas plantean problemas para la obtención de una prueba histológica, debido a su localización, y pueden requerir biopsias repetidas de la nasofaringe, o la toma de una muestra ganglionar cervical.

Tabla 5. Clasificación TNM (tumor-ganglios-metástasis) de los Carcinomas de la nasofaringe. Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), 1997/2002 ⁽⁵⁶⁾

T1 Tumor limitado a la nasofaringe			
T2 Extensión a los tejidos blandos de la orofaringe y/o de las fosas nasales			
T2a Sin extensión parafaríngea			
T2b Con extensión parafaríngea			
T3 Invasión de las estructuras óseas y/o de los senos paranasales			
T4 Extensión endocraneal y/o afectación de los nervios craneales y/o de la fosa infratemporal y/o de la hipofaringe y/o la órbita			
N0 Ausencia de ganglios cervicales			
N1 Ganglios unilaterales (<6cm) supraclaviculares			
N2 Ganglios bilaterales (<6cm) supraclaviculares			
N3a Ganglios >6cm supraclaviculares			
N3b Extensión en las fosas supraclaviculares			
Estadios			
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
IIA	T2a	N0	M0
IIB	T1	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N0, N1	M0
III	T1	N2	M0
	T2a, T2b	N2	M0
	T3	N0,1,2	M0
IVA	T4	N0,1,2	M0
IVB	cualquier T	N3	M0
IVC	cualquier T	cualquier N	M1

d) Metastásica

Son infrecuentes en el momento del diagnóstico (menos del 5%) y afectan sobre todo al hueso o al hígado. Plantean un problema en cuanto al esquema terapéutico, que debe dar prioridad a una quimioterapia más prolongada y a una irradiación locorregional condensada ^(14, 15, 21). El pronóstico parece ser mejor en los pacientes que tengan metástasis óseas aisladas, con supervivencias prolongadas superiores a los 5 años ^(14, 15). Las metástasis aún siguen siendo un escollo terapéutico, a pesar de la mejoría del control locorregional que aporta la quimio-radioterapia.

7. Diagnóstico diferencial del CNF

a) Linfomas

Son los tumores no epiteliales más frecuentes, en los que debe pensarse sobre todo en los niños. El linfoma suele ser nasosinusal y nasofaríngeo, por lo general de alto grado de malignidad ⁽¹⁰⁹⁾. Los linfomas de tipo T angiocéntricos y destructivos pueden afectar a la rinofaringe. La inmunohistoquímica tiene un papel destacado al demostrar una positividad de los marcadores linfocíticos (antígeno leucocitario común) o de tipo B ó T ⁽¹⁰⁹⁾.

b) Tumores de los tejidos blandos

Entre las enfermedades benignas, predominan sobre todo los angiofibromas en los adolescentes de sexo masculino, que pueden

causar epistaxis repetidas o ronquidos ⁽¹¹⁰⁾. En los niños, la nasofaringe representa, en el caso de los tumores de tipo rabdomiosarcoma, la segunda localización después de la órbita ⁽¹¹¹⁾. Los datos microscópicos permiten diferenciarlos, en los casos dificultosos las tinciones de inmunohistoquímicas para marcadores biogénicos como mioglobina, actina músculo-específica o desmina permite el diagnóstico.

El CNF que presenta un componente fusocelular marcado, puede mimetizar a un sarcoma de alto grado. En muchos casos se llega al diagnóstico por la identificación en algunos focos de un componente de CNF típico que se confirma con inmunotinción positiva a citoqueratina.

c) Melanoma

La mayoría de los melanomas malignos del tracto respiratorio superior contienen pigmento melánico intracitoplásmico, en estos casos el diagnóstico es sencillo. El aspecto acrómico del melanoma puede plantear un problema diagnóstico ⁽¹¹²⁾. En estos casos, la inmunotinción fuertemente positividad para HMB45, Melan A, S100 y desmina, permiten diferenciarlo del CNF.

d) Adenocarcinoma

Son muy frecuentes a nivel de la nasofaringe. En la mayoría de los casos presentan un patrón arquitectural de tipo túbulo papilar y en

algunos incluyen células caliciformes (tipo intestinal). Son neoplasias localmente agresivas, con tendencia a las recidivas locales a pesar de ser bien diferenciada. Las metástasis ganglionares linfáticas son raras. Las similitudes morfológicas no concuerdan con el estudio molecular para mutaciones del K-ras y de la proteína p53 halladas en los adenocarcinomas colorectales.



PLANTEAMIENTO DEL TEMA

El carcinoma nasofaríngeo se presenta con baja incidencia en los países occidentales, siendo muy frecuente en países asiáticos donde se ha vinculado, en su patogénesis, con la infección endémica por el virus de Epstein-Barr. En consecuencia, en estos últimos países, se han realizado numerosos estudios y publicaciones sobre distintos aspectos clínicos de la enfermedad, sobre su patogénesis y sobre los métodos terapéuticos aplicados y el resultado o respuesta a los mismos.

En los países occidentales, sin embargo, al ser la incidencia más baja, la enfermedad ha recibido menos atención por parte de los investigadores en todos sus aspectos. Por este motivo se entiende importante contribuir a su mejor conocimiento, evaluando parámetros clínicos, morfológicos y biomoleculares de un grupo poblacional del medio europeo. Algunos trabajos con parecida intención han sido recientemente publicados por investigadores italianos y suecos, entre otros.

El conjunto de casos estudiados en el presente trabajo pretende tres objetivos fundamentales. El primero de ellos consiste en valorar las características clínicas y el diagnóstico morfológico convencional de cada uno y hacer un estudio comparativo del grupo poblacional con otros grupos del medio asiático, sobre todo en lo que

se refiere a la edad de aparición, sexo, tipo histológico y estadio en el momento del diagnóstico.

El segundo objetivo pretende contribuir a una mayor información sobre la tumorigénesis, evaluando algunos factores que intervienen en la cinética biomolecular de los tumores epiteliales en general y que pueden condicionar la respuesta terapéutica.

El tercer objetivo, en relación con los anteriores, se concreta en conocer la respuesta a la terapéutica aplicada en cada caso, partiendo del necesario condicionante evolutivo que ha supuesto la mejora progresiva de los procedimientos radio y quimioterápicos propios de estos tumores, ya que no es accesible a tratamiento quirúrgico



MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha realizado una búsqueda retrospectiva en los archivos de los Departamentos de Anatomía Patológica del H.U. Virgen Macarena (Sevilla) y del Hospital Comarcal Infanta Margarita (Cabra, Córdoba) de todos los diagnósticos de Carcinoma Nasofaríngeo emitidos desde el año 1985 hasta el año 2008, seleccionando un total de 26 y 7 casos respectivamente.

En este material se han llevado a cabo un estudio detallado de las variables clínicas, anatomopatológicas y moleculares.

A. ESTUDIOS CLÍNICOS

Hemos revisado la información clínica y anatomo-patológica de todos los pacientes, recogiendo de cada caso los siguientes datos:

- *Edad* (años): los pacientes se han clasificado por décadas, tomando como línea de corte los 50 años.
- *Sexo*: el que corresponda.
- *Evolución clínica*: Se distingue entre intervalo libre de enfermedad o supervivencia libre de enfermedad (aparición de recidivas o metástasis), y supervivencia global. Se definió la recidiva como la aparición de tumor después de la intervención inicial. Existencia o no de metástasis ganglionares al diagnóstico y estadio clínico-patológico de la enfermedad según la clasificación AJC/UICC.

Todos estos datos aparecen recogidos en la siguiente tabla:

	Edad	Sexo	Metástasis al inicio	Tipo histológico	Estadio	Tratamiento	Evolución
1	59	Hombre	SI	TIPO 3	ESTAD II	QT+RT	Recidiva/mtx
2	46	Hombre	NO	TIPO 2	ESTAD IV	QT+RT	Libre de enf.
3	47	Hombre	SI	TIPO 2	ESTAD IV	QT+RT	Recidiva/mtx
4	71	Hombre	SI	TIPO 2	ESTAD II	QT+RT	Exitus
5	57	Hombre	SI	TIPO 2	ESTAD II	QT+RT	Recidiva/mtx
6	59	Hombre	SI	TIPO 3	ESTAD IV	QT+RT	Libre de enf
7	64	Mujer	SI	TIPO 1	ESTAD III	QT+RT	Exitus
8	56	Hombre	NO	TIPO 2	ESTAD II	QT+RT	Libre de enf
9	65	Mujer	SI	TIPO 2	ESTAD III	QT+RT	Exitus
10	55	Mujer	SI	TIPO 1	ESTAD II	QT+RT	Recidiva/mtx
11	53	Mujer	SI	TIPO 2	ESTAD II	QT+RT	Exitus
12	51	Hombre	SI	TIPO 2	ESTAD II	QT+RT	Exitus
13	66	Hombre	SI	TIPO 2	ESTAD II	QT+RT	Exitus
14	51	Mujer	SI	TIPO 2	ESTAD II	QT+RT	Exitus
15	25	Hombre	SI	TIPO 3	ESTAD III	QT+RT	Libre de enf
16	63	Hombre	NO	TIPO 2	ESTAD I	QT+RT	Libre de enf
17	64	Hombre	SI	TIPO 3	ESTAD II	QT+RT	Libre de enf
18	64	Hombre	NO	TIPO 2	ESTAD II	QT+RT	Recidiva/mtx
19	49	Hombre	NO	TIPO 2	ESTAD II	QT+RT	Libre de enf
20	63	Hombre	SI	TIPO 2	ESTAD III	QT+RT	Libre de enf

	Edad	Sexo	Metástasis al inicio	Tipo histológico	Estadio	Tratamiento	Evolución
21	71	Hombre	NO	TIPO2	ESTAD II	QT+RT	Libre de enf
22	46	Hombre	NO	TIPO3	ESTAD III	QT+RT	Exitus
23	46	Hombre	NO	TIPO3	ESTAD II	QT+RT	Exitus
24	32	Hombre	NO	TIPO3	ESTAD IV	QT+RT	Libre de enf
25	64	Hombre	NO	TIPO3	ESTAD II	QT+RT	Libre de enf
26	63	Hombre	SI	TIPO3	ESTAD II	QT+RT	Recidiva/mtx
27	48	Hombre	SI	TIPO3	ESTAD IV	QT+RT	Recidiva/mtx
28	55	Hombre	SI	TIPO2	ESTAD II	QT+RT	Recidiva/mtx
29	48	Hombre	SI	TIPO3	ESTAD III	QT+RT	Libre de enf
30	70	Hombre	SI	TIPO3	ESTAD IV	QT+RT	Exitus
31	78	Mujer	NO	TIPO 2	ESTAD II	QT+RT	Recidiva/mtx
32	60	Mujer	SI	TIPO3	ESTAD III	QT+RT	Libre de enf
33	63	Hombre	SI	TIPO3	ESTAD IV	QT+RT	Libre de enf.

Tabla 6 cont.

B. MÉTODOS

1. Estudios histológicos

Las muestras se fijaron en formol tamponado al 10%, se incluyeron en parafina de forma rutinaria y se tiñeron cortes de 5 μm con hematoxilina-eosina.

De cada caso se observaron todas las preparaciones disponibles (entre 1 y 5) y se estudiaron los siguientes parámetros histológicos: grado de diferenciación morfológica de las células epiteliales, queratinización, presencia o no de puentes intercelulares y componente linfoide estromal.

El diagnóstico histológico fue realizado por dos patólogos a doble ciego, según la clasificación de la OMS, estableciéndose el resultado final mediante consenso llevado a cabo en un segundo tiempo.

2.- Estudio inmunohistoquímico

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron utilizando el sistema automatizado de *VENTANA*. Para ello se seleccionaron, en la medida de lo posible los bloques más representativos.

En la **Tabla 7** aparecen relacionados los anticuerpos primarios (Diagnostic biosystem, proveedor ATOM) y la dilución utilizada.

Se ha utilizado el acondicionador celular Reaction Buffer CCI suave para todos los anticuerpos excepto para p16 para el que se usa CCI Standard (60 min.).

Los tiempos de incubación para los anticuerpos p16, Ciclina D1, EGFR, p53, y ki67 son: 32 min., 28 min., 40 min., 1h 28 min., y 28 min respectivamente.

Tabla 7.-

ANTICUERPO	TIPO ANTICUERPO	DILUCIÓN
P16	monoclonal	prediluido
Ciclina D1	monoclonal	prediluido
EGFR	monoclonal	prediluido
P53	monoclonal	prediluido
Ki 67 (MIB1)	monoclonal	prediluido

a.- Cuantificación de resultados

Se utilizó el objetivo de 40X y contando 100 células por caso. La inmunotinción para las reacciones con los anticuerpos p16, ciclina D1, EGFR, p53 y Ki 67 se evaluaron en función de la intensidad y proporción:

- **p16 y Ciclina D1:** Se valoró tan sólo la tinción nuclear considerando como positiva cuando >5% de las células tumorales mostraban tinción nuclear y negativa si son ≤5% de las células. Se determinó que el punto de corte fuese del 5% a fin de adecuarnos a otros estudios realizados anteriormente.
- **EGFR:** En este caso se consideró la tinción de membrana, siendo valorada como positiva cuando el porcentaje de células tumorales que mostraban inmunorreacción es ≥10%.

- **Ki67 y p53:** La inmunotinción se observó en el núcleo, valorándose el porcentaje de células que mostraban tinción. Para p53, se consideró positiva cuando el porcentaje de células tumorales era >10%, en el caso de ki67 se consideró como positiva cuando el porcentaje es >30%.

En un intento de conseguir una mayor aproximación de esta valoración a la realidad, la metodología ha sido aplicada por dos patólogos a doble ciego. Los valores obtenidos del estudio inmunohistoquímico se resumen en la **Tabla 8**.

3. Estudio molecular

Se realizó mediante técnicas de hibridación in situ con fluorescencia (FISH).

Se aplicaron las sondas LSI p16 (9p21)/CEP 9, Cyclin D1 (11q13)/CEP11 y LSI EGFR/CEP 7 (Vysis, Abbot laboratorios. Proveedor: IZASA) con el fin de estudiar los genes referidos.

En síntesis, el método utilizado fue el siguiente:

1. Montaje de los cortes de tejido parafinado (3-4 micras) sobre el portaobjetos organosilanizado y permanencia en estufa a 60° C toda la noche.
2. Desparafinado con xilol e hidratación posterior con etanol a concentraciones decrecientes (100%, 80%, 70%) de forma progresiva hasta terminar en agua destilada.
3. Desenmascaramiento con calor. Sumergidos en tampón citrato permanecieron 3 minutos a partir de que comenzaran a hervir.

4. Tras lavarlo en agua destilada se procedió a la digestión y fijación de la muestra con proteínasa K a 37° C (0,250 ml de proteínasa K en 50 ml de PBS) durante 15 minutos.
5. Inclusión de los portas en 2xSSC a 5° C durante 5 minutos.
6. Secado en placa a 45-50°, inclusión en formalina tamponada durante 10 minutos.
7. Nuevo lavado en 2xSSC durante 5 minutos a temperatura ambiente.
8. Codesnaturalización e hibridación de las muestras con las sondas LSI p16 SpectrumOrange/CEP 9 SpectrumOrange, LSI Cyclin D1 (11q13) SpectrumOrange/CEP 11 SpectrumGreen y LSI EGFR SpectrumOrange/CEP 7 SpectrumGreen en placa a 90° C, durante 5 minutos.
9. Tras sellado en cámara húmeda a 37° C, durante 18 horas, se realizaron los lavados posthibridación (2XSSC/0,3% NP40) a 73° C y a temperatura ambiente.
10. Contratinción con la tinción de contraste DAPI y secado en oscuridad.

a. Interpretación de resultados

En las células diploides normales, el patrón esperado es de dos señales rojas y dos señales verdes. En verde se marcan los centrómeros de los cromosomas 7, 9 y 11; y en rojo los genes a estudiar (p16, ciclina D1 y EGFR).

ESTUDIO DEL GEN *CCND1*: Se utilizó la sonda *LSI Cyclin D1 (11q13) SpectrumOrange/ CEP 11 SpectrumGreen (Vysis)*, cuya sonda control marca

en verde el centrómero del cromosoma 11 y en rojo el gen *ciclina D1*, y así poder determinar el número de copias del *locus Ciclina D1* en la región 11q13. Cuando una célula presenta amplificación del locus ciclina D1, se observan más de 3 señales rojas.

ESTUDIO DEL GEN *EGFR*: La sonda *LSI EGFR* (7p12) SpectrumOrange/ *CEP 7* SpectrumGreen (Vysis), detecta y cuantifica el número de copias del gen del *Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR)* localizado en 7p12. La sonda control marca el centromero del cromosoma 7. Un número anormal de copias está indicado por tres o más señales rojas.

ESTUDIO DEL GEN *p16*: Esta sonda (*LSI p16* (9p21) SpectrumOrange/ *CEP 9* SpectrumGreen) (Vysis), permite detectar deleciones y amplificaciones en la región 9p2. Cuando una célula presenta deleción, el patrón que se observa es una señal roja y dos señales verdes

b. Cuantificación de resultados

Se llevó a cabo mediante un microscopio de fluorescencia NIKON (modelo Eclipse 80I). Se realizó el recuento de señales en al menos 200 núcleos no solapados, cuantificándose el porcentaje de núcleos celulares con alteraciones. Se consideró deleción del gen cuando más del 55% de los núcleos presentaban 0 ó 1 señal, y amplificación del gen cuando más del 30% de los núcleos presentaban más de 4 copias (**Tabla 8**) (pags 86 y 87).

4. Estudio estadístico

a. Objetivos

- Realizar un estudio descriptivo de cada variable por separado.
- Estudiar la asociación entre variables clínicas, inmunohistoquímicas y moleculares

b. Variables

Los grupos formados con las variables estudiadas fueron:

Variables clínicas

- Edad: 0, <50 años; 1, ≥50 años
- Sexo: 0, varón; 1, mujer
- Supervivencia libre de enfermedad: Se midió en meses. Tiempo que transcurre desde que el paciente está en remisión completa hasta que presenta recidiva de la enfermedad.
- Supervivencia global: se midió de forma continua en meses.

Variables histológicas

- 1, Tipos 1 y 2; 2, Tipo 3.

Variables Inmunohistoquímicas

- P16: 0: negativa (<10% de células tumorales positivas); 1: positiva (≥10%).
- Ciclina D1: 0: no sobreexpresión; 1: sobreexpresado.
- EGFR: Valoración igual que Ciclina D1.
- P53: 0: ≤10%; 1: >10%. ki 67: 0: ≤30%; 1: >30%.

Variables moleculares

- Se valoró el porcentaje de células con 0, 1, 2, 3 ó más de 3 señales de cada gen (p16, CCDND1 y EGFR).
- Deleción /Amplificación: 0: no; 1: Sí.

c. Estudios realizados

Para el tratamiento de los datos se ha utilizado la aplicación estadística SPSS 12.0. Para estudiar cada uno de los objetivos mencionados en el planteamiento, se han utilizado los siguientes métodos estadísticos:

- Confección de las tablas de frecuencias y medidas estadísticas adecuadas de cada variable individualmente.
- Cálculo de medidas descriptivas para cada variable individualmente.
- Cálculo de tablas de contingencia y pruebas chi-cuadrado (y test exacto de Fisher si procede) para estudiar si existe asociación entre los marcadores inmunohistoquímicos, moleculares, clínicos y morfológicos. Consideramos que la asociación es estadísticamente significativa si $p < 0,05$.
- Las probabilidades actuariales (más-menos error estándar) para la Supervivencia Libre de Enfermedad y para la Supervivencia Global, se calcularon mediante el método de Kaplan Meier.

	Edad	Sexo	Tipo histológico	Gen p16	Gen CCND1	Gen EGFR	Expresión p16	Expresión CCND1	Expresión EGFR	Ki67 (%)	P53 (%)
1	59	Hombre	TIPO 3	Normal	Normal	Normal	No	Sí	Sí	>30	≥10
2	46	Hombre	TIPO 2	Delección	Amplificado	Normal	No	No	Sí	>30	≥10
3	47	Hombre	TIPO 2	Normal	Amplificado	Normal	No	No	Sí	>30	<10
4	71	Hombre	TIPO 2	Normal	Normal	Amplificado	No	Sí	No	>30	<10
5	57	Hombre	TIPO 2	Normal	Amplificado	Normal	No	Sí	No	>30	<10
6	59	Hombre	TIPO 3	Delección	Normal	Normal	No	No	Sí	>30	<10
7	64	Mujer	TIPO 1	Normal	Normal	Normal	Sí	No	Sí	>30	<10
8	56	Hombre	TIPO 2	Delección	Amplificado	Normal	No	No	No	>30	≥10
9	64	Mujer	TIPO 3	Delección	Normal	Normal	Sí	No	Sí	>30	<10
10	54	Mujer	TIPO 1	Delección	Normal	Normal	No	No	Sí	≤30	≥10
11	51	Mujer	TIPO 2	Delección	Amplificado	Amplificado	No	Sí	Sí	>30	<10
12	58	Hombre	TIPO3	Normal	Normal	Normal	No	No	No	>30	≥10
13	73	Hombre	TIPO3	Normal	Normal	Normal	No	No	Sí	>30	<10
14	51	Mujer	TIPO 2	Delección	Amplificado	Normal	No	No	No	≤30	≥10
15	25	Hombre	TIPO3	Normal	Normal	Normal	No	Sí	Sí	>30	<10
16	72	Hombre	TIPO2	Normal	Normal	Amplificado	No	No	No	≤30	10
17	74	Hombre	TIPO3	Normal	Normal	Normal	No	No	No	>30	<10
18	74	Hombre	TIPO 2	Normal	Normal	Normal	No	Sí	No	>30	≥10
19	49	Hombre	TIPO3	Normal	Amplificado	Normal	No	Sí	No	>30	<10
20	63	Hombre	TIPO3	Normal	Amplificado	Normal	No	Sí	No	>30	≥10

Tabla 8

	Edad	Sexo	Tipo histológico	Gen p16	Gen CCND1	Gen EGFR	Expresión p16	Expresión CCND1	Expresión EGFR	Ki67 (%)	P53 (%)
21	71	Hombre	TIPO 2	Normal	Amplificado	Normal	No	Sí	No	≤30	<10
22	46	Hombre	TIPO 3	Normal	Amplificado	Normal	No	Sí	No	>30	≥10
23	46	Hombre	TIPO 3	Normal	Amplificado	Normal	No	Sí	No	≤30	≥10
24	32	Hombre	TIPO 3	Delección	Normal	Normal	No	Sí	Sí	>30	<10
25	64	Hombre	TIPO 3	Normal	Normal	Normal	No	Sí	Sí	>30	<10
26	60	Hombre	TIPO 3	Delección	Normal	Normal	No	Sí	Sí	>30	<10
27	44	Hombre	TIPO 3	Normal	Normal	Normal	No	Sí	Sí	>30	<10
28	55	Hombre	TIPO 2	Normal	Normal	Normal	No	Sí	Sí	>30	<10
29	44	Hombre	TIPO 3	Normal	Normal	Normal	No	Sí	Sí	>30	<10
30	69	Hombre	TIPO 3	Normal	Normal	Normal	No	Sí	Sí	>30	≥10
31	78	Mujer	TIPO 2	Delección	Normal	Normal	Sí	No	Sí	>30	≥10
32	60	Mujer	TIPO3	Normal	Normal	Normal	No	No	Sí	>30	<10
33	63	Hombre	TIPO3	Delección	Normal	Normal	No	Sí	Sí	>30	<10

Tabla 8 cont.



RESULTADOS

A.- CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS

Se incluyeron en el estudio 33 pacientes cuyas características clínico-patológicas se resumen en la **Tabla 9**.

TABLA 9: Resumen de las características clínico-patológicas y evolución de los pacientes:

Características	Nº de pacientes
Nº total de pacientes	33
Edad	
<40	2
41-50	7
51-60	11
>60	13
Sexo	
Hombre	26
Mujer	7
Estadaje UICC	
Temprano (I-II)	18
Tardío (III-IV)	15
Tratamiento recibido	
RT	0
QT	0
RT+QT	33
Estado de supervivencia	
Vivos	22
Sin enfermedad (después de ttº)	15
Recidivas y/o metástasis	7
Fallecidos	11

- **EDAD:** Oscila entre 25 y 78 años, con una media de 55,94 años, mediana de 59 años y 2 modas, 46 y 64 años. Se advierte que la mayor incidencia

corresponde a la 7ª década de la vida y a partir de los 60 años (66,66 %) (grupo 2).

TABLA 10. Clasificación de los casos por edad

Años	Nº de pacientes	%	Grupo	Nº de pacientes	%
<40	2	6,06	1	9	27,3 %
41-50	7	21,21			
51-60	11	33,33	2	24	72,7 %
>60	13	39,39			

- **SEXO:** Los varones son 26 y las mujeres 7. Existe un neto predominio de los varones con una relación 3.8:1. (se le ha asignado el valor 0: Varón y 1: Mujer).

TABLA 11. Clasificación de los casos por sexo

SEXO	Frecuencia	Porcentaje
VARON	26	78,8
MUJER	7	21,2
	33	100,0

- **ESTADIAJE (Según la AJC/UICC):** Predominan ligeramente los estadios tempranos (I y II) 54.54%, sobre los tardíos (III y IV) 45.45%. El mayor porcentaje corresponde al Estadío II (51,5%).

TABLA 12. Estadiaje según AJC/UICC

	Frecuencia	Porcentaje
Estad. I-II	18	54,5
Estad. III-IV	15	45,5
	33	100,0

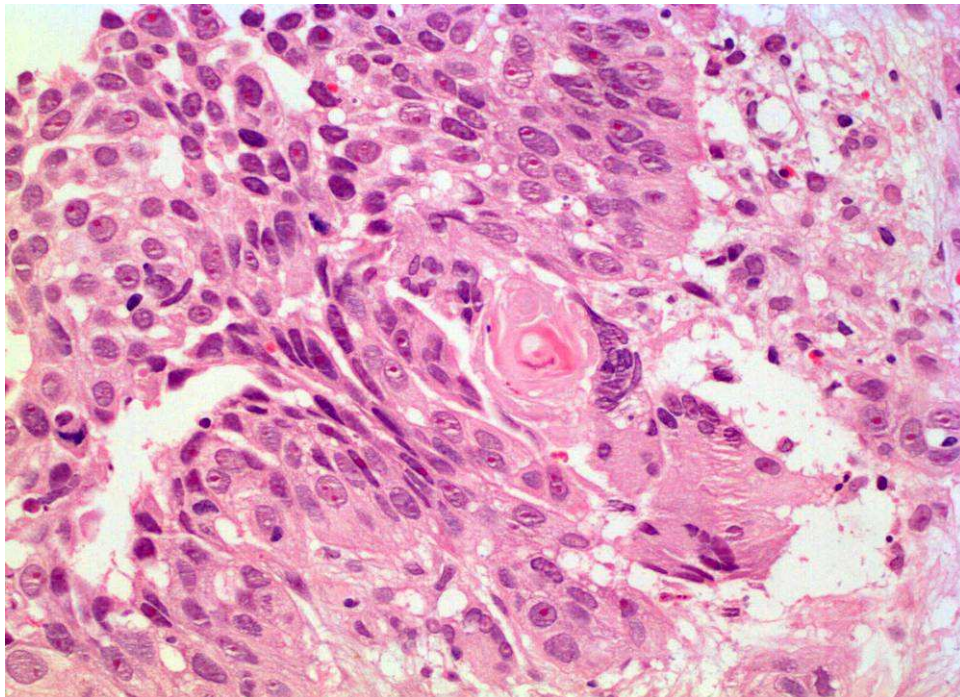
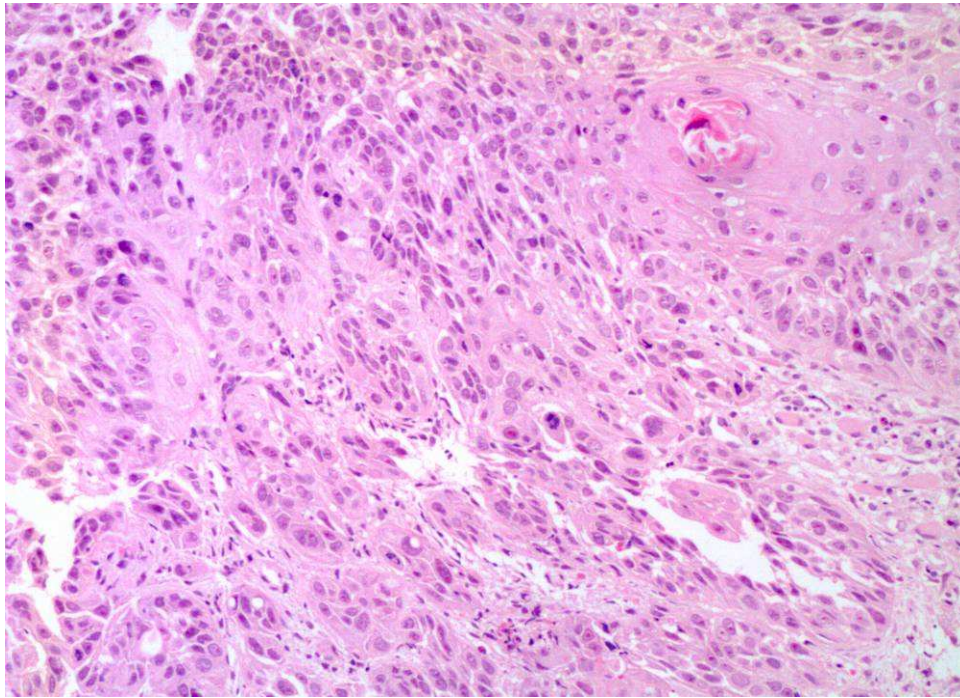
- **TIPO HISTOLOGICO (Según la clasificación de la OMS):**

De los 33 casos del estudio, 2 (6,1%), se clasificaron como tipo 1 de la OMS o carcinomas bien diferenciados (diferenciación epidermoide, con puentes intercelulares y depósitos de queratina de aspecto perlado) (**figs. 8 y 9**).

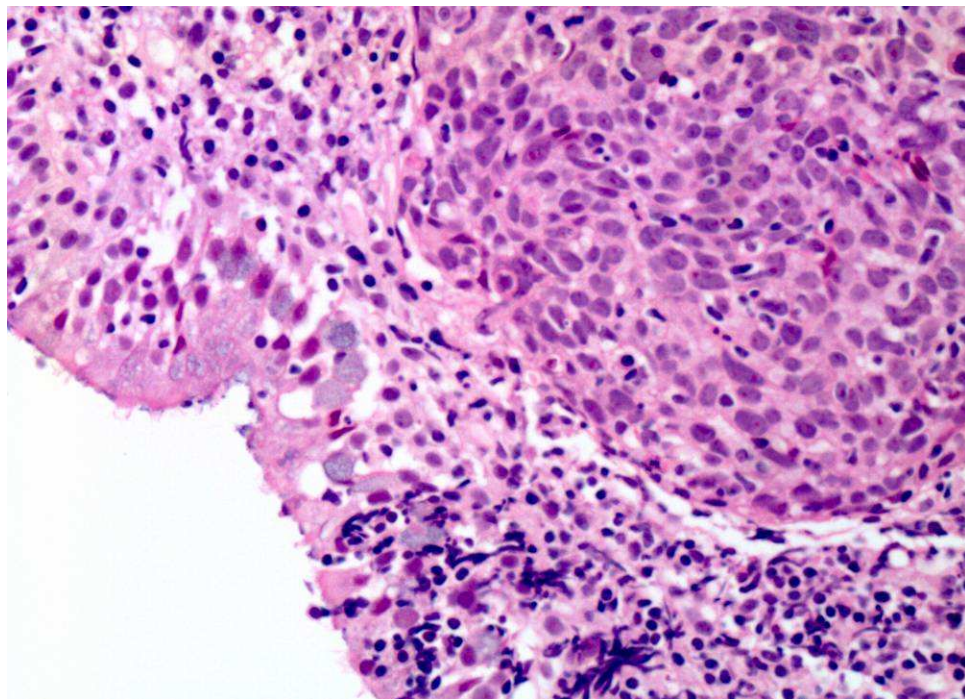
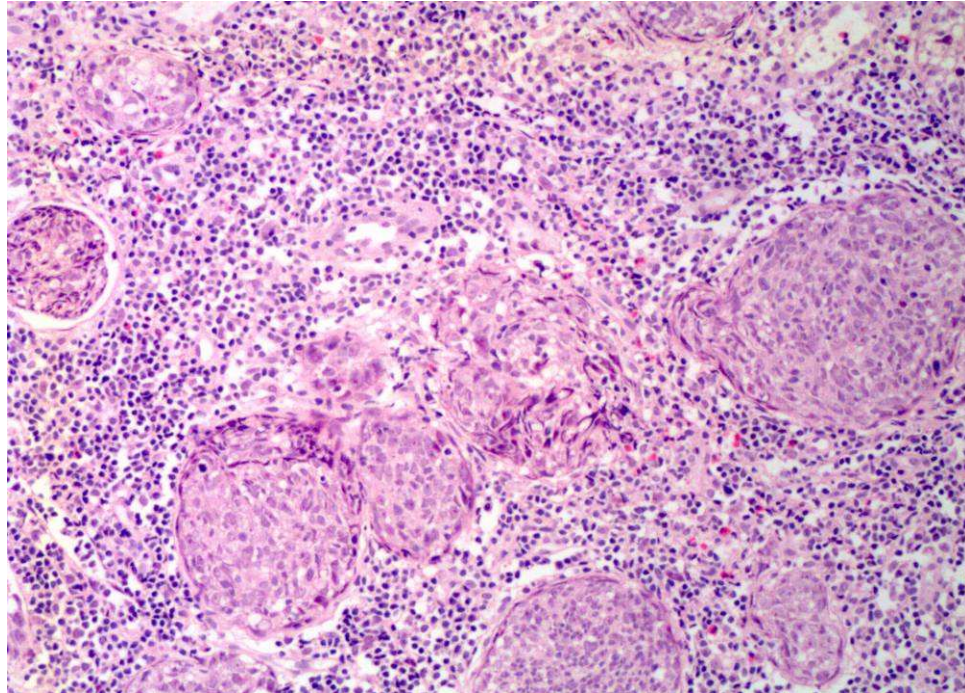
El 51% (17 casos) se han clasificado como tipo 2 de la OMS o carcinomas no queratinizante (**figs. 10 y 11**).

Finalmente, como tipo 3 de la OMS o carcinomas indiferenciados se han clasificado 14 casos (42,4%) (proliferación linfoepitelial, células linfoides que “rompen” el tumor en nidos con patrón sincitial; células con núcleo redondeado y nucleolo prominente) (**figs. 12 y 13**).

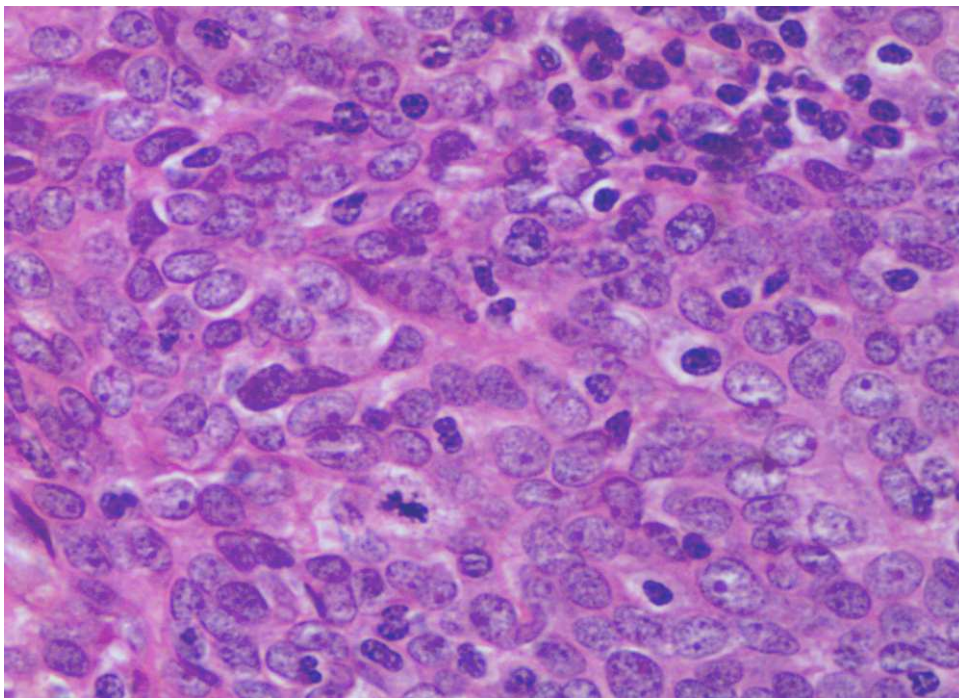
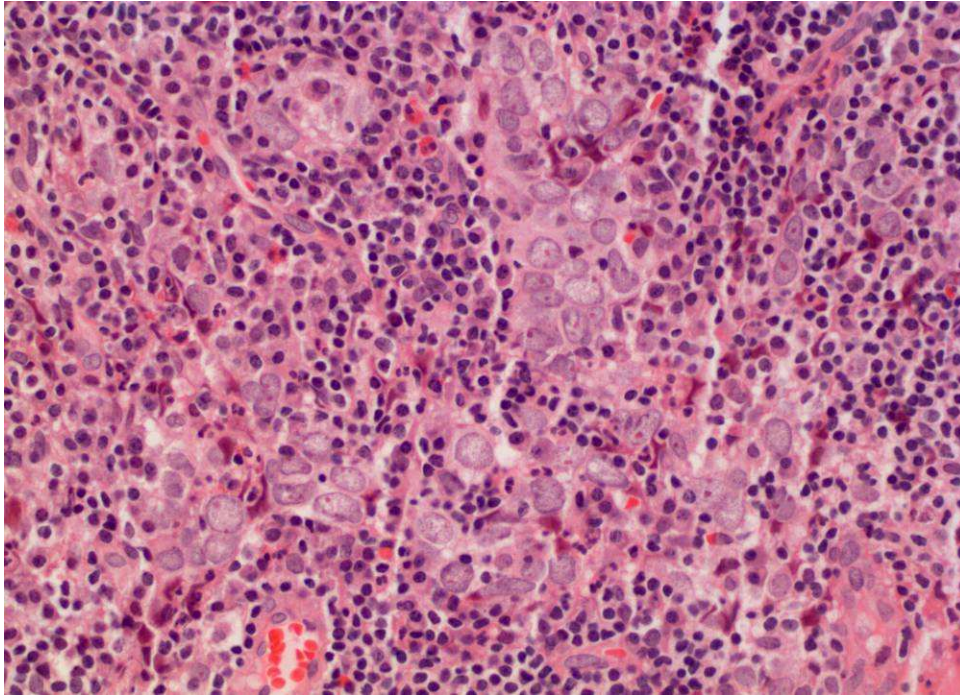
El tipo histológico más frecuente en nuestra serie es el tipo 2 con un porcentaje del 51,5%. Los Tipos 1 y 2 se han agrupado asignándoles el valor 0 y al Tipo 3 el valor 1.



Figuras 8 y 9.- Carcinoma nasofaríngeo bien diferenciado (Tipo I): Las células tumorales muestran diferenciación escamosa y queratinización. (HE; 7: x10; 8: x20)



Figuras 10 y 11.- Carcinoma nasofaríngeo no queratinizante. Nidos de células sin diferenciación escamosa clara. (HE; 10: x10; 11: x20)



Figuras 12 y 13.- Carcinoma Nasofaríngeo indiferenciado (Tipo III): Proliferación linfoepitelial, las células linfoides “rompen” el tumor. Las células neoplásicas muestran núcleo vesicular con nucleolo prominente. (HE; 12: x20; 13: x40).

- **TRATAMIENTO:** El 100% de los pacientes del estudio recibieron tratamiento combinado de quimioterapia más radioterapia.
- **EVOLUCIÓN CLÍNICA:** La evolución clínica fue valorada en los 33 casos. 22 pacientes (66,7%) están vivos; de éstos 15 permanecen libres de enfermedad y 7 tuvieron recidiva después del primer tratamiento (6 recidivas locales y 1 metástasis a distancia). 11 (33,3%) fallecieron, de éstos 4 no presentaron remisión de la neoplasia tras tratamiento y 6 presentaron recidiva del tumor.

De los 33 pacientes, independientemente de su fallecimiento, 14 presentaron recidiva después del primer tratamiento (42,4%).

El tiempo libre de enfermedad (Supervivencia libre de enfermedad) oscila entre 6 y 120 meses, siendo la media de 32,79 meses.

La supervivencia global media es de 40,31 meses, oscilando entre 1 y 120 meses.

B.- CARACTERÍSTICAS INMUNOHISTOQUÍMICAS

- **p16 y Ciclina D1:** Se valoró tan sólo la tinción nuclear considerando como positiva cuando >5% de las células tumorales mostraban tinción nuclear y negativa si son <5% de las células.

De los 33 casos, 30 (90,9%) mostraban pérdida de la expresión de la proteína p16 y los 3 restantes, un 9,1%, mostraban tinción positiva (**figs. 14 y 15**).

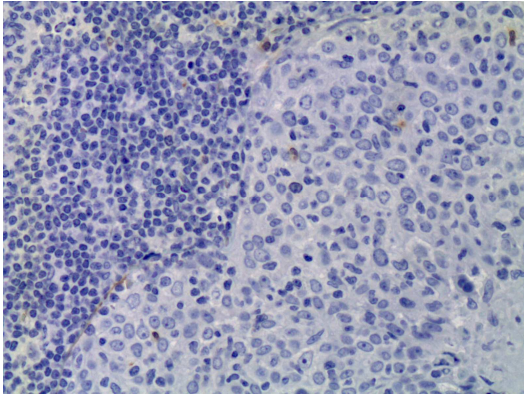


Figura 14.- p16 negativa. 10x

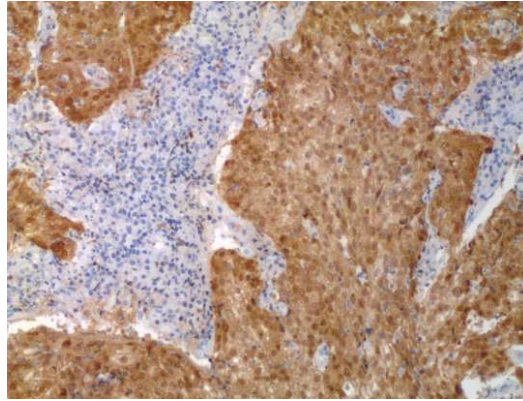


Figura 15.- p16 positiva. 10x

En cuanto a la ciclina D1 un 57,6 % (19 casos), presentaban sobreexpresión de la proteína mientras que el 42,4% (14 casos) no (**figs. 16 y 17**).

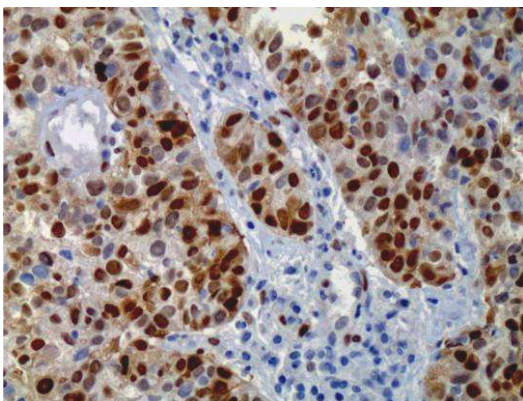


Figura 16.- Ciclina D1 positiva. 20x

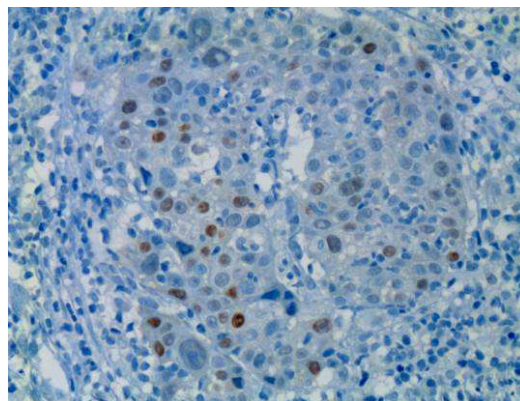


Figura 17.- Ciclina D1 negativa. 20x

- **EGFR:** En este caso se consideró la tinción de membrana, siendo valorada como positiva cuando el porcentaje de células tumorales que mostraban inmunorreacción es $\geq 10\%$.

20 casos de los 33 (el 60,6%), mostraban sobreexpresión de la proteína y en 13 (39,4%) es negativa (**figs. 18 y 19**).

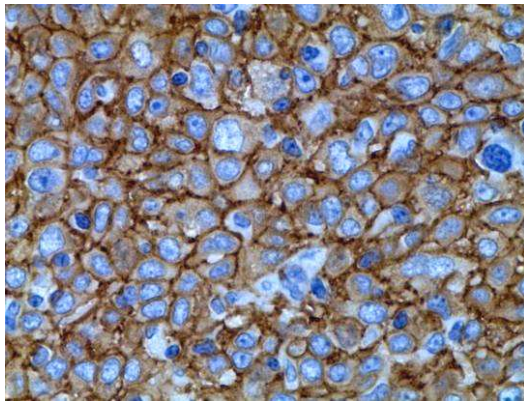


Figura 18.- EGFR positiva. 40x

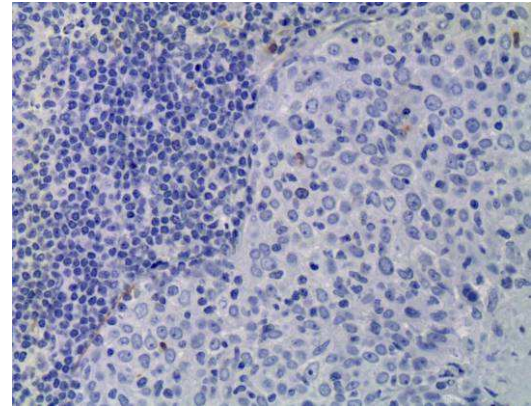


Figura 19.- EGFR negativa. 20x

- **Ki67 y p53:** La inmunotinción se observó en el núcleo, valorándose el porcentaje de células que mostraban tinción.

El 84,8% de los casos (28) mostraron $>30\%$ de células con tinción positiva para Ki67 y en 5 casos (15,2%) el porcentaje era $\leq 30\%$ de células (**figs 20 y 21**).

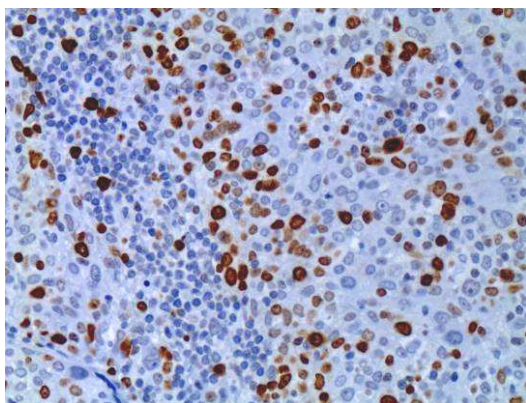


Figura 20.- ki67. 40x

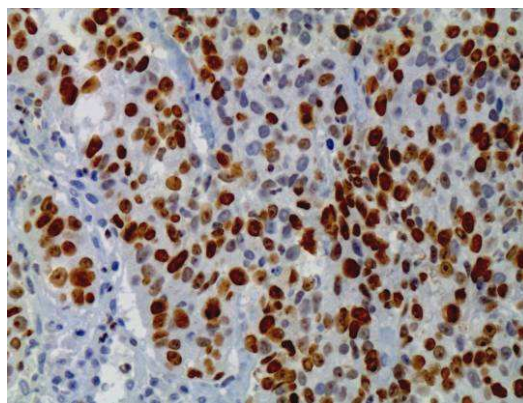


Figura 21.- ki67 40x

En cuanto a los resultados de p53, 21 casos (63,6%) mostraban tinción positiva en <10% de células y 12 (el 36,4%) presentaban tinción positiva en \geq 10% de las mismas (**figs. 22 y 23**).

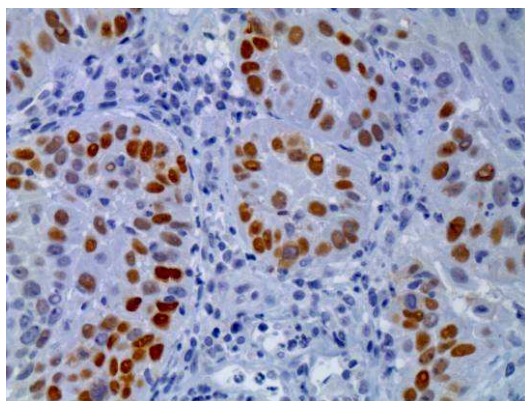


Figura 22.- p53. 40x

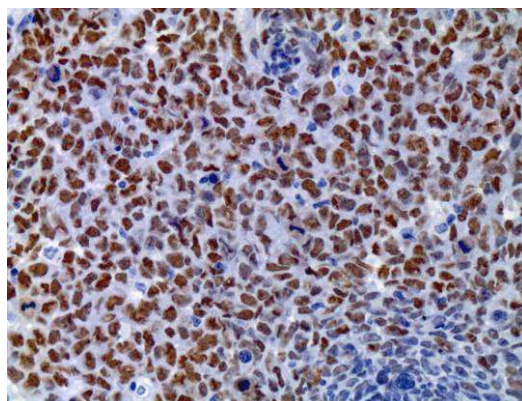


Figura 23.- p53. 20x

C.- FISH EN CARCINOMA NASOFARÍNGEO

Se realizó en los 33 casos. Un 33,3% de ellos (11 casos) mostraron deleción del gen p16. Igualmente, un 33,3% (11 casos) mostraron amplificación del gen ciclina D1 y tan sólo un 9,1% (3 casos) mostraron amplificación del gen EGFR (**figs. 24, 25 y 26**).

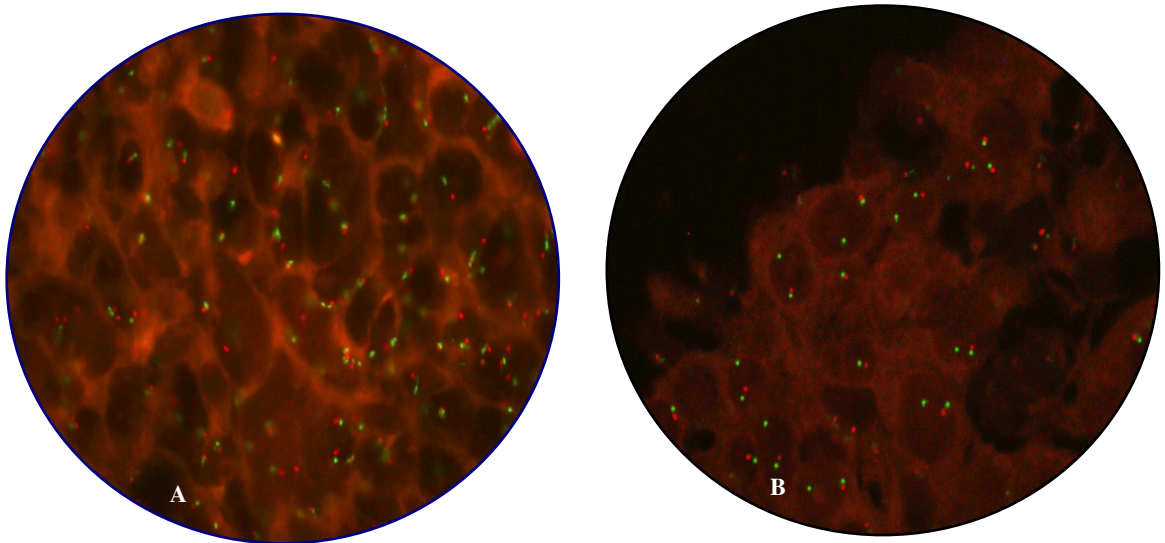


Figura 23.- FISH. **A**, modelo de hibridación normal con la sonda LSI p16. **B**, Delección del gen *p16*.

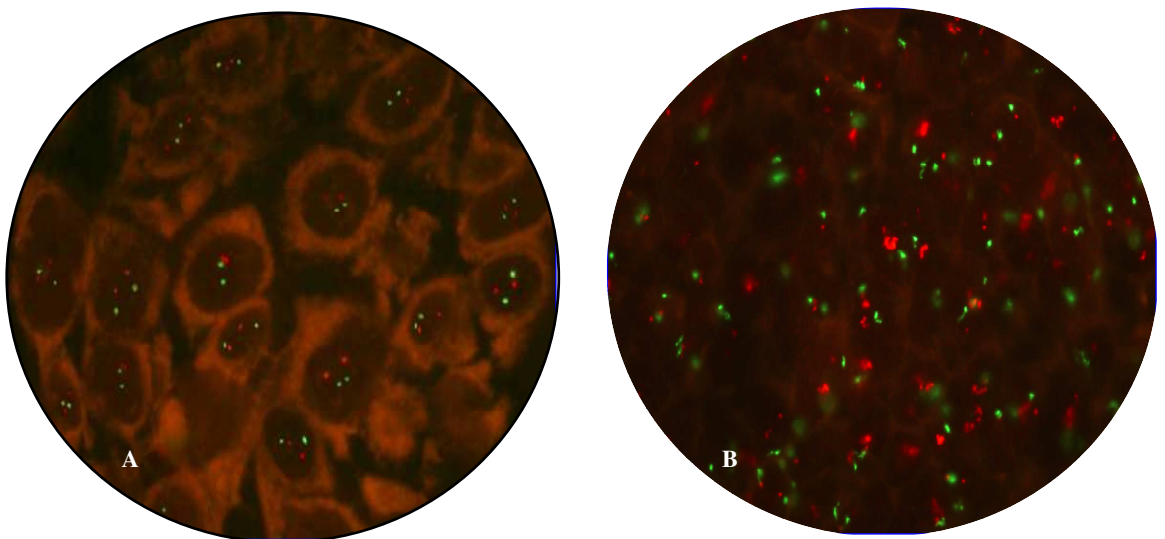


Figura 24.- FISH. **A**, modelo de hibridación normal con la sonda LSI Cyclin D1. **B**, Amplificación del gen *ciclina D1*.

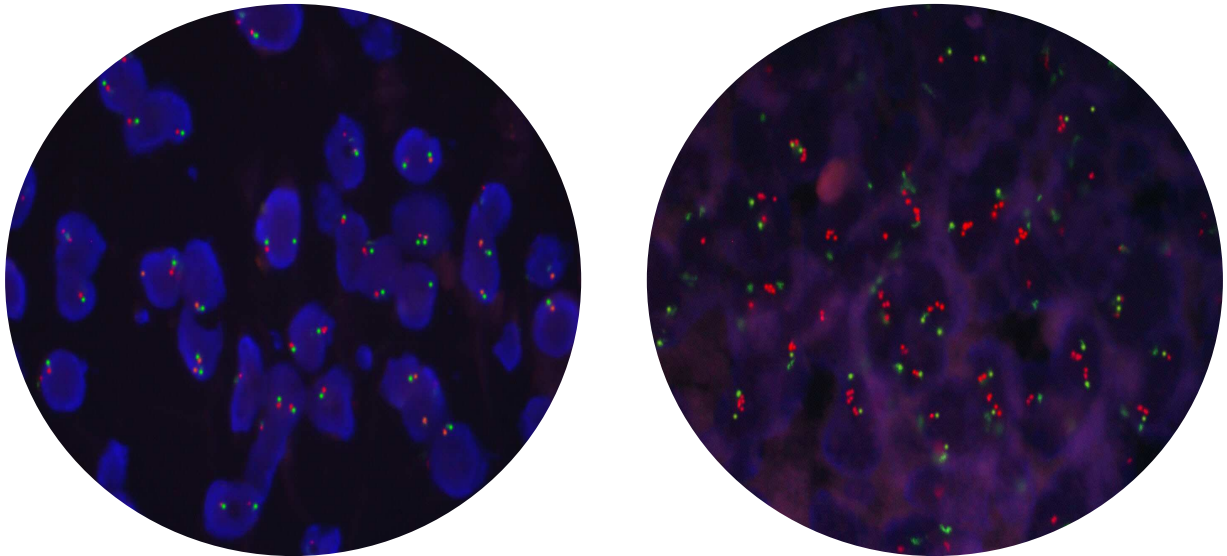


Figura 25.- FISH. **A**, modelo de hibridación normal con la sonda LSI EGFR. **B**, amplificación del gen *EGFR*.

D.- ESTUDIO ESTADÍSTICO

La asociación entre las diferentes variables la hemos realizado sobre el global de los tumores (n=33).

1.- ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS.

- Hemos advertido asociación estadísticamente significativa entre la edad de los pacientes (\geq de 50 años) y el estadiaje según la AJC/UICC ($p= 0,002$). No hemos encontrado asociación entre la edad y la presencia de recidiva ($p=0,280$). Hemos observado que existe una relación no estadísticamente significativa ($p=0,084$), con el tipo histológico, así como con la presencia de metástasis en el

momento del diagnóstico ($p=0.097$), siendo más frecuente en el grupo de mayor edad (≥ 50 años).

TABLA 22: Tabla de asociación **edad/estadiaje AJC/IUCC** ($p= 0.002$)

		ESTADIO		Total
		I-II	III-IV	
EDAD	<50	1	8	9
	≥ 50	17	7	24
		18	15	33

TABLA 23: Tabla de asociación **edad/presencia de recidivas** ($p= 0,280$)

		RECIDIVA		Total
		NO	SI	
EDAD	<50	6	3	9
	≥ 50	9	11	20
		15	14	29

TABLA 24: Tabla de asociación **edad/Tipo histológico** ($p=0.084$)

		TIPO HISTOLÓGICO		Total
		TIPO 1-2	TIPO 3	
EDAD	<50	3	6	10
	≥ 50	16	8	23
		19	14	33

TABLA 25: Tabla de asociación **edad/Metástasis al inicio** ($p=0,097$)

		METÁSTASIS		Total
		NO	SI	
EDAD	<50	5	4	9
	≥ 50	6	18	24
		11	22	33

- No hemos observado asociación estadísticamente significativa entre el sexo y las distintas variables clínicas e histológicas. Tan sólo hemos advertido que existe una relación ($p= 0,090$), aunque no estadísticamente significativa, entre las variables sexo y tipo histológico, predominando los tipos I-II en las mujeres.

TABLA 26: Tabla de asociación **sexo/ recidiva** ($p=0,311$)

		RECIDIVA		Total
		NO	SI	
SEXO	VARON	13	10	23
	MUJER	2	4	6
		15	14	33

TABLA 27: Tabla de asociación **sexo/ Tipo Histológico** ($p=0,090$)

		TIPO HISTOLOGICO		Total
		TIPO 1-2	TIPO 3	
SEXO	VARON	13	13	26
	MUJER	6	1	7
		19	14	33

- No hemos encontrado asociación estadísticamente significativa entre las variables Tipo Histológico (según la OMS) y el número de mitosis, presencia de recidiva y mortalidad. Sí hemos advertido que existe una relación con el estadiaje según la AJCC/UICC ($p=0,062$).

TABLA 28: Tabla de asociación **Tipo histológico/Presencia de recidiva** ($p=0,340$)

		RECIDIVA		Total
		NO	SI	
Tipo Histológico	TIPO 1-2	7	9	16
	TIPO 3	8	5	13
		15	14	29

TABLA 29: Tabla de asociación **Tipo Histológico/Estadaje** ($p=0,062$)

		ESTADIO		Total
		I-II	III-IV	
Tipo Histológico	TIPO 1-2	13	6	19
	TIPO 3	5	9	14
		18	15	33

2.- ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES INMUNOHISTOQUÍMICAS, CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS.

- Hemos advertido que existe una relación sin significación estadística, entre la expresión de p16 y la presencia de recidivas ($p= 0,058$). Los pacientes en los que el tumor mostró positividad para p16 presentaron recidiva.

También existe asociación estadística entre la pérdida de expresión de p16 y la sobreexpresión de ciclina D1 ($p=0,034$). No hemos visto asociación estadística entre p16, tipo histológico, estadio, presencia de metástasis al inicio o mortalidad. Sí hemos observado que en cuanto al tipo histológico, el tipo II se asocia con la pérdida de expresión de p16 ($p=0,061$).

- Al cruzar la variable expresión de ciclina D1 con las variables clínicas e histológicas, tan sólo hemos advertido que existe una asociación estadística entre la sobreexpresión de ciclina D1 y el tipo histológico ($p=0,036$).

TABLA 30. Tabla de asociación **p16/presencia de recidivas** ($p=0,058$)

		RECIDIVA		Total
		NO	SI	
Expresión de p16	SI	0	3	3
	NO	15	11	26
		15	14	29

TABLA 31. Tabla de asociación **p16/Ciclina D1** ($p=0,034$)

		Sobreexpresión de ciclina D1		Total
		NO	SI	
Expresión de p16	SI	3	0	3
	NO	11	19	30
		14	19	33

TABLA 32. Tabla de asociación **Ciclina D1/Tipo Histológico** ($p=0,036$)

		Tipo Histológico		Total
		TIPO 1-2	TIPO 3	
Sobreexpresión de Ciclina D1	NO	11	3	14
	SI	8	11	19
		19	14	33

- En cuanto a la expresión de EGFR, sí se observa que existe asociación, aunque no estadísticamente significativa, con el tipo histológico ($p= 0,070$). Los tumores con el tipo histológico III muestran expresión intensa de EGFR con mayor frecuencia.

TABLA 33. Tabla de asociación **EGFR/Tipo Histológico** ($p= 0.070$)

		Tipo Histológico		
		TIPO 1-2	TIPO 3	Total
Sobreexpresión de EGFR	NO	10	3	13
	SI	9	11	20
		19	14	33

También hemos advertido asociaciones estadísticamente significativas de la sobreexpresión de EGFR con el estadio tumoral ($p=0,037$) y con la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico ($p=0,044$).

TABLA 34. Tabla de asociación **EGFR/Estadaje (según la AJCC/UICC)** ($p=0,037$)

		ESTADIO		Total
		I-II	III-IV	
Sobreexpresión de EGFR	NO	10	3	13
	SI	8	12	20
		18	15	33

TABLA 35. Tabla de asociación **EGFR/Metástasis al inicio** (p=0,044)

		METÁSTASIS		Total
		NO	SI	
Sobreexpresión de EGFR	NO	7	6	13
	SI	4	16	20
		11	22	33

- Hemos obtenido asociación estadísticamente significativa entre la expresión de la oncoproteína p53 y la presencia de recidiva (p=0,039); pero no con la presencia de metástasis al inicio (p=0,125); tipo histológico (p=0,424) ni estadio (p=0,290).

TABLA 36. Tabla de asociación **p53/Recidiva** (p=0,039)

		RECIDIVA		Total
		NO	SI	
p53	<10%	12	6	18
	≥10%	3	8	11
		15	14	29

- No hemos encontrado asociación entre el índice de proliferación (ki67) y las distintas variables clínicas e histológicas.

3.- ASOCIACIÓN ENTRE VARIABLES CLÍNICAS, MORFOLÓGICAS, INMUNOHISTOQUÍMICAS Y FISH.

- Hemos encontrado asociación estadísticamente significativa ($p=0,016$) entre las variables sexo y FISH para p16. Las mujeres han presentado delección del gen p16 con mayor frecuencia que los hombres.

TABLA 37. Tabla de asociación **sexo/FISH p16** ($p= 0,016$)

		Delecion gen p16 (FISH)		Total
		NO	SI	
SEXO	VARON	20	6	26
	MUJER	2	5	7
		22	11	33

- No hemos encontrado asociación estadística entre la delección del gen p16 y las variables clínicas, tipo histológico e inmunohistoquímicas.

TABLA 38. Tabla de asociación **FISH p16/Tipo Histológico** ($p= 0.618$)

		Tipo Histológico		Total
		TIPO 1-2	TIPO 3	
FISH p16	NO	12	10	22
	SI	7	4	11
		19	14	33

- Sin embargo sí hemos observado una asociación estadísticamente significativa entre las variables Amplificación del gen Ciclina D1 por FISH

y tipo histológico ($p= 0,046$). Además hemos observado que existe una relación, aunque no estadísticamente significativa, con la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico ($p=0,068$). No así con el resto de las variables clínicas e inmunohistoquímicas.

TABLA 39. Tabla de asociación **FISH CCND1/ Tipo Histológico** ($p= 0,046$)

		Tipo Histológico		
		TIPO 1-2	TIPO 3	Total
Amplificación gen <i>CCND1</i>	NO	10	12	22
	SI	9	2	11
		19	14	33

TABLA 40. Tabla de asociación **FISH CCND1/ Metástasis al inicio** ($p=0,068$)

		Metástasis al inicio		
		NO	SI	Total
Amplificación gen <i>CCND1</i>	NO	5	17	22
	SI	6	5	11
		11	22	33

- En cuanto a la amplificación del gen EGFR hemos observado una asociación estadísticamente significativa entre ésta y los pacientes que no

remitieron después del tratamiento ($p= 0,003$), y una relación, aunque no estadísticamente significativa ($p=0,097$), con el estadio según la AJCC/UICC.

TABLA 41. Tabla de asociación **FISH EGFR/ESTADIO** ($p=0,097$)

		ESTADIO		Total
		I-II	III-IV	
Amplificación gen <i>EGFR</i>	NO	15	15	30
	SI	3	0	3
		18	15	33

TABLA 42. Tabla de asociación **FISH EGFR/Remisión** ($p=0,003$)

		REMISIÓN		Total
		SI	NO	
Amplificación gen <i>EGFR</i>	NO	27	2	29
	SI	1	2	3
		28	4	32

TABLA 43. Tabla de asociación **FISH EGFR/Tipo Histológico** ($p=0.119$)

		TIPO HISTOLOGICO		Total
		TIPO 1-2	TIPO 3	
Amplificación gen <i>EGFR</i>	NO	16	14	30
	SI	3	0	3
		19	14	33

- Utilizando la función de Kaplan-Meier y el test de Long-rank para el estudio de supervivencia, hemos observado que, aunque no hay diferencia estadísticamente significativa entre la delección de p16 y la Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE). Los casos con delección presentan un tiempo libre de enfermedad de 30 ± 7 meses, mientras que los que no la muestran, el tiempo libre de enfermedad es de 62 ± 12 . Es decir que aquellos casos con delección del gen p16 recidivan antes que los que no la muestran. No hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los casos que presentan amplificación de los genes Ciclina D1 y EGFR (**fig 26**).

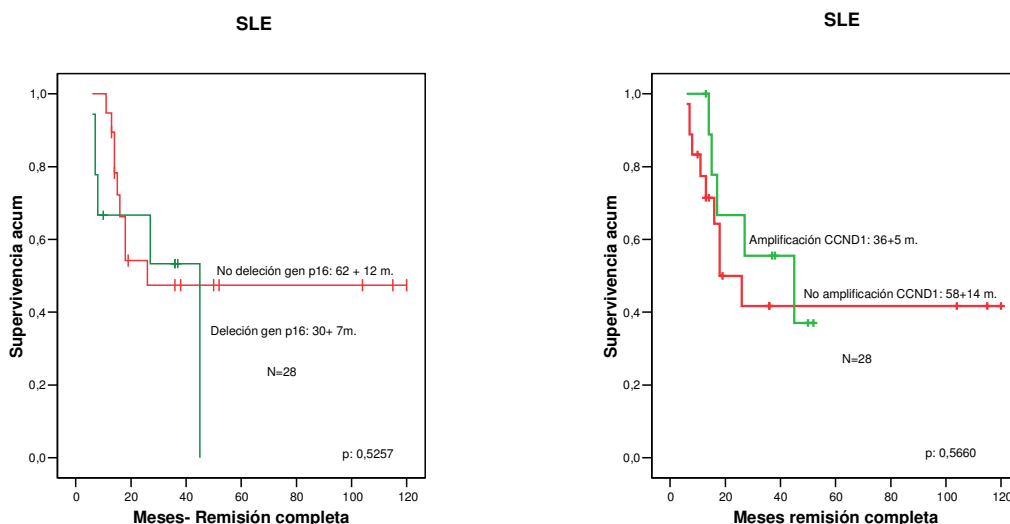


Figura 25: Supervivencia Libre de Enfermedad de los pacientes con delección del gen p16 y amplificación del gen CCND1.

- En cambio, sí hemos observado diferencia estadísticamente significativa ($p=0.012$) en la Supervivencia libre de Enfermedad y la tinción con p16. Los tumores que presentaron inmunotinción intensamente positiva para p16

tienen un tiempo libre de enfermedad de 16 ± 6 meses, mientras que los que mostraron tinción negativa el tiempo libre de enfermedad es de 65 ± 12 meses (**fig.26**).

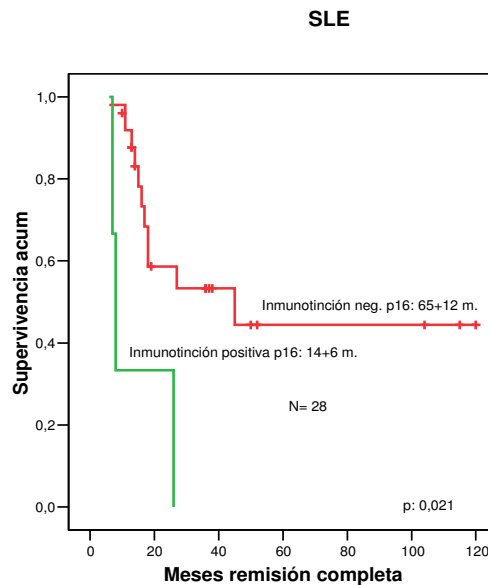


Figura 26.- Supervivencia Libre de Enfermedad de los pacientes con recidiva según la tinción de p16.

- En cuanto a las variables clínicas, hemos observado que existe una cierta correlación ($p=0.061$) con el Estadaje según la AJC/UICC y la Supervivencia Libre de Enfermedad. Sin embargo no hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la Supervivencia libre de Enfermedad al correlacionarla con la edad, tipo histológico según la clasificación de la OMS, inmunotinción para ciclina D1 y EGFR, Ki67 y p53. Respecto a la oncoproteína p53, si bien no hay diferencias significativas, sí hemos observado que los casos que muestran inmunotinción positiva de $\geq 10\%$ tienen un tiempo medio de supervivencia libre de enfermedad de 27

meses, para los que tienen <10% de tinción positiva es de 69 meses (**Fig. 27**)

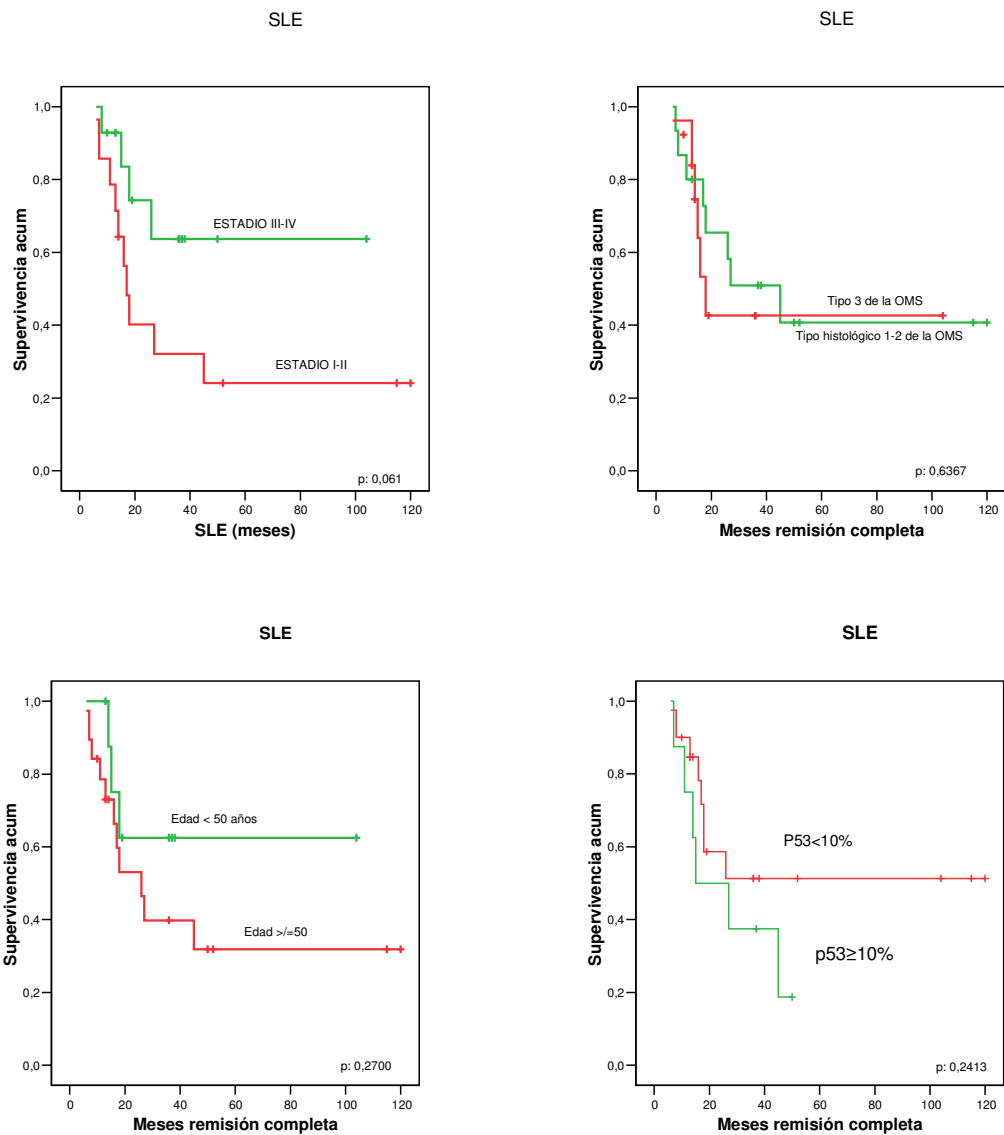


Figura 27.- Supervivencia Libre de Enfermedad de los pacientes en función de las variables estadiaje, tipo histológico, edad y positividad a p53.

En cuanto a la supervivencia global (SG), no hemos encontrado correlación con las distintas variables inmunohistoquímicas y moleculares.



DISCUSIÓN

En el grupo de los cánceres de cabeza y cuello, el CNF representa una entidad distintiva en términos de epidemiología, presentación clínica, marcadores biológicos, factores pronósticos, tratamiento y evolución.

En el presente estudio, realizado sobre 33 casos de CNF hemos pretendido comparar la distribución y frecuencia de las variables histológicas, moleculares e inmunohistoquímicas con lo establecido en trabajos previamente publicados. Pero lo que nos interesa, fundamentalmente, es conocer si las alteraciones moleculares estudiadas tienen repercusión sobre la evolución clínica.

En la mayoría de las poblaciones, independientemente de la raza o etnia, la incidencia del CNF es mayor en hombres que en mujeres con una relación 2-3:1. En nuestra serie, 26 (78,8%) son varones y 7 (21,2%) mujeres. Existe un claro predominio de los varones con una relación 3.8:1. Resultados que coinciden con los de Parkin y cols⁽¹⁹⁾, Lee y cols⁽²⁰⁾ y Morales-Angulo y cols⁽¹¹³⁾. Estos últimos realizaron un estudio sobre 82 pacientes de Cantabria. De ellos 65 (79.3%) eran varones con una relación de 3.8:1.

La distribución del CNF según la edad muestra distintos patrones según las distintas poblaciones. En la mayoría de las poblaciones de bajo riesgo, la incidencia del CNF crece con la edad, de manera muy parecida a cómo lo hace la mayoría de las neoplasias epiteliales. Por el contrario, en la población de alto riesgo del Sur de China de ambos sexos (según Parkin y cols), la incidencia del CNF aumenta con la edad hasta un pico entre los 45 y 54 años, disminuyendo en edades más avanzadas⁽¹⁹⁾. En el estudio de Burt y cols en estadounidenses, población de bajo a moderado riesgo de CNF, muestran un segundo pico de incidencia entre los adolescentes y adultos jóvenes (20 años)⁽¹¹⁴⁾. En nuestra

serie la media de edad es de 58 años, con una mayor incidencia entre los 50-70 años, siendo muy baja por debajo de los 40. Resultados muy similares a los obtenidos por otros autores europeos (Morales-Angulo y cols ⁽¹¹³⁾; d'Espiney Amaro y cols ⁽¹¹⁵⁾, Nesic y cols ⁽¹¹⁶⁾).

El tipo histológico más frecuente, siguiendo la clasificación de la OMS (adviértase que la clasificación de la OMS que hemos seguido en este estudio es la del año 1978 y no la última publicada de 1991), en las regiones de alto riesgo es el tipo III, que comprende el 95 % de los CNF. En los países de bajo riesgo, según algunos autores, el tipo histológico más frecuente es el tipo 1 ⁽⁸⁾. En nuestra serie, el tipo 2 (17 casos, 51,5%) predomina ligeramente sobre el 3 (14 casos, 42,4%), siendo muy poco frecuente el tipo 1 con tan sólo 2 casos. Nuestros resultados difieren en parte de los estudios mencionados anteriormente. Morales-Angulo y cols (113) encontraron que el más frecuente es el tipo 3 con un 71%; d'Espiney Amaro y cols ⁽¹¹⁵⁾ en su estudio realizado sobre la población portuguesa, también encontraron que el tipo 3 es el más frecuente aunque el porcentaje es menor que en el anterior (58%).

El tratamiento standard para el CNF es la radioterapia, aunque la adyuvancia con quimioterapia aumenta el ratio de supervivencia. Como en otras neoplasias, el pronóstico del CNF depende del tamaño tumoral, afectación de ganglios linfáticos y metástasis a distancia (Estadío TNM) ⁽¹¹⁸⁾. Pero, en contraste con otras neoplasias de cabeza y cuello, el CNF es altamente sensible a la radiación y quimioterapia ⁽⁵³⁾. La mayor tasa de supervivencia se ha descrito para los estadios I yII de la enfermedad, sin embargo el pronóstico es peor para la enfermedad metastásica, incluso con el tratamiento combinado de radiación y quimioterapia

con recaídas de la enfermedad de hasta el 82% ⁽¹¹⁹⁾, por lo que se necesita desarrollar nuevos tratamientos para el CNF.

Debido a esto y en la búsqueda de nuevas vías de tratamiento, en las últimas décadas, y en base al desarrollo de la biología molecular, se ha ampliado el conocimiento del CNF.

Amplificaciones específicas en el CNF, identificadas por estudios citogenéticos y de HGC, han implicado múltiples oncogenes en la patogénesis del CNF. Los oncogenes identificados incluyen BCL2, CCND1, EGFR, EVI1, HER2/ERB2, HRAS, MDM2, MYC Y PIK3CA, que pueden mostrar amplificación, sobreexpresión o mutaciones ⁽³⁹⁾. Para algunos de estos genes, tales como CCND1, que codifica la proteína ciclina D1, estudios funcionales han demostrado su potencial oncogénico en células del CNF ⁽⁴⁵⁾.

Se han detectado múltiples anomalías genéticas y epigenéticas de varios genes supresores tumorales en el CNF. Las regiones más comúnmente afectadas son 9p21 y 3p, que tienen hasta un porcentaje de 85-95% de delección en tumores invasivos. Los genes supresores tumorales afectados incluyen aquellos localizados en la región 9p21 (p16, p15 y p14ARF) y en la región 3p21.3 (RASSF1A, BLU/ZMYND10 y CACCNA2D2). La expresión de p16, RASSF1A o BLU/ZMYND10 en líneas celulares del CNF lleva a una inhibición significativa del crecimiento celular, formación de colonias o crecimiento de tumores en animales inmunodeficientes, lo que nos proporciona una evidencia de que estos genes funcionan como genes supresores tumorales en el CNF ⁽³⁹⁾.

Existen estudios publicados sobre los genes involucrados en la carcinogénesis de distintos tipos de tumores por técnicas de FISH, no así en el CNF ^(120, 121, 122, 123).

Okami y cols. estudiaron la amplificación de ciclina D1 por técnicas de FISH en 23 casos de carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC) identificándola en 4/11 casos (36%) de tumores primarios. Además, detectaron inactivación de p16, por técnicas de inmunohistoquímica, en 19 de 23 (83%) casos y encontraron alteración concomitante de p16 y ciclina D1 en 4 de 11 tumores primarios, sugiriendo que estos dos componentes no son mutuamente excluyentes y que ambos pueden estar alterados en una proporción significativa de tumores primarios. La amplificación de ciclina D1 puede estar relacionada con un peor pronóstico ⁽¹²⁴⁾.

Hui y cols. realizaron un estudio de hibridación genómica comparada en 26 casos de CNF con el fin de investigar las alteraciones genéticas involucradas en la carcinogénesis del CNF e identificar los genes supresores tumorales. Encontraron ganancia de la región 11q13.1-13.3 en un 61.5% de los casos y pérdida del 9p21.3 en un 76.9% ⁽⁴⁵⁾. Asimismo estudiaron la expresión de Ciclina D1 por técnicas de inmunohistoquímica sobre cortes de tejido parafinado de 38 casos de CNF a los que también se determinó el número de copias de 11q13 por técnica de FISH, observando que 35 de los 38 casos (92.1%) mostraban sobreexpresión de ciclina D1 y que existía correlación concordante entre la ganancia del número de copias de 11q13 y la sobreexpresión de ciclina D1 en 27 casos (80%). Estos hallazgos les sugirieron que la ciclina D1 es el oncogén diana de la amplificación del locus 11q13 en el carcinoma nasofaríngeo. En cuanto al

gen p16 detectaron delección homocigota por técnica de FISH en un 53.5% y pérdida de la expresión de la proteína por inmunohistoquímica en un 86.8%.

En nuestra serie, hemos estudiado las alteraciones de estos dos genes por técnicas de FISH así como la expresión de las dos proteínas por técnicas de inmunohistoquímica, observando que de los 33 casos de CNF se identifica amplificación del gen de la CCND1 en 11 (33,3%) y delección del gen de la p16 en 11 de los 33 casos (33,3%). Por técnicas de inmunohistoquímica detectamos sobreexpresión de ciclina D1 en 19 de los 33 casos (57,6%), pérdida de la expresión de p16 en 30 de los 33 (90,9%), existiendo alteración concomitante de p16 y CCND1 en 4 de los 33 casos. Nuestros resultados se aproximan más a los de Okami y cols, si bien el porcentaje de casos que presentan alteración concomitante es tan sólo de un 12,12% frente al 36,36% que presentan Okami y cols. Hemos encontrado correlación entre la amplificación del gen CCND1 y la sobreexpresión de la proteína en 7 de los 33 casos (24,24%), resultado que se aleja del obtenido por el grupo de Hui.

Debido a la asociación funcional de la ciclina D1 y la proteína p16, estos autores también estudiaron la correlación entre la pérdida de p16 y la activación de ciclina D1 en los 38 casos de carcinoma nasofaríngeo. En 31 de los 38 casos se detectaron sobreexpresión de ciclina D1 y pérdida de p16. Estos resultados sugieren que ambos genes (*p16* y *CCND1*) son críticos para el desarrollo del carcinoma nasofaríngeo ⁽⁴⁵⁾. En nuestra serie detectamos que en 19 casos existía sobreexpresión de CCND1 y pérdida de p16, existiendo una relación entre estos dos eventos ($p=0,034$). Si bien el porcentaje es menor que el obtenido por Bik-Yu

y cols, el resultado va en el mismo sentido y nos indica que ambos genes pueden estar involucrados en la génesis del CNF.

En este sentido, Lin y cols. estudiaron la expresión de ciclina D1 y p16 en carcinoma nasofaríngeo recidivante en 42 pacientes. Observaron expresión de ciclina D1 en el 26% y de p16 en el 4% de ellos. No encontraron asociación entre la sobreexpresión de ciclina D1 y el aumento de riesgo de recidiva ⁽⁵⁷⁾. Otros autores, como Vielba y cols han observado asociación entre la sobreexpresión de ciclina D1 y un peor pronóstico ⁽¹²⁵⁾. Sin embargo, Hwang y cols, en una serie de 65 pacientes, encontraron que la pérdida de expresión de ciclina D1 estaba muy relacionada con la recurrencia local después del tratamiento con radioterapia ⁽¹²⁶⁾.

En cambio, Lin y cols, sí hallaron pérdida de la expresión de p16 en casi todos los casos recidivados (96%). Al igual que Hwang y cols, que encontraron una asociación significativamente estadística entre la pérdida de expresión de p16 y una alta incidencia de recidiva local ^(57, 126). Makitie y cols, en un estudio realizado sobre 84 muestras de CNF, también encontraron asociación estadísticamente significativa ($p=0,022$) entre la ausencia de expresión de p16 y una menor tasa de supervivencia ⁽¹²⁷⁾. Todo esto sugiere que la pérdida de p16 puede estar asociada con una mayor probabilidad de recaída después del tratamiento con radio y quimioterapia. Por tanto la expresión de p16 un marcador pronóstico útil en el carcinoma nasofaríngeo.

Lin y cols no encontraron significación estadística en cuanto a la supervivencia libre de enfermedad, al relacionarla con variables como la edad, tinción con ciclina D1, tinción con p16, clasificación de la OMS o recidiva ⁽⁵⁷⁾.

En nuestra serie hemos observado que de los 29 casos recidivaron 14 (42.4%) y de éstos 8 (57,1%) mostraban, mediante técnicas de inmunohistoquímica, sobreexpresión de CCND1; 11 (85,7%) mostraban expresión de p16, aunque no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa. Esto se aproxima a los resultados de Lin y cols e iría a favor de que la expresión de p16 pueda ser un marcador pronóstico útil. Sin embargo, con la técnica de FISH, los resultados no son concluyentes ya que observamos que de los 14 casos que recidivaron, 5 muestran amplificación del gen CCND1 (35,8%) y 5 delección del gen p16 (35,8%).

Al igual que Lin y cols., en relación a la supervivencia libre de enfermedad (SLE), no hemos encontrado diferencias significativas con las variables amplificación del gen *CCND1*, edad, clasificación de la OMS y tinción con ciclina D1. Sí observamos que, aunque no hay diferencia estadísticamente significativa con la variable delección de *p16*, los casos que muestran delección del gen tienen menor tiempo libre de enfermedad (recidivan antes) que los casos que no la presentan (30 meses de media frente a 66 meses de los casos que no muestran delección). En cambio, nuestros resultados con la tinción de p16 son contradictorios, si bien el 89,28% de los casos que recidivaron mostraron pérdida de expresión de p16, los 3 casos que presentaron tinción positiva (2 con tinción intensa y 1 con tinción positiva aunque menor del 5%) recidivaron antes con una media de 14 meses frente a los 66 de los negativos. Esto podría ser debido a que en estos 3 casos, el comportamiento biológico sea más parecido al de los carcinomas de células escamosas de cabeza y cuello, en los que parece que,

como ocurre en los carcinomas de cervix uterino, la expresión de p16 es un factor de mal pronóstico ^(128, 129, 130).

Otro de los genes involucrados en la carcinogénesis tumoral es el *EGFR*. Hui y detectaron en un estudio realizado mediante hibridación genómica comparada amplificación del locus 7p12 que codifica el gen *EGFR* ⁽⁴⁵⁾.

El *EGFR* está frecuentemente sobreexpresado en los tumores de cabeza y cuello, y se ha relacionado con un peor control locorregional del tumor y menores tasas de supervivencia ⁽¹³¹⁾. También se encuentra comúnmente expresado en pacientes con CNF (73-100%) y existe una evidencia cada vez mayor, acerca del impacto negativo de esta sobreexpresión en la supervivencia de estos pacientes. Ma y cols pudieron demostrar que la sobreexpresión de EGFR, medida por el aumento de intensidad de la tinción, se correlacionaba significativamente con el estadio tumoral avanzado, menor tiempo de progresión y menor tasa de supervivencia libre de enfermedad ⁽⁸⁷⁾. Taheri-Kadkoda y cols. realizaron un estudio en el que identificaron los patrones de expresión de 4 biomarcadores mediante técnicas de inmunohistoquímica, entre ellos el EGFR, en un grupo de pacientes con CNF. En este estudio, realizado sobre 45 muestras de CNF, encontraron expresión del EGFR en el 96% de los especímenes con un ratio de sobreexpresión del 80%. Sin embargo no encontraron correlación entre la sobreexpresión de EGFR y la edad, sexo, el estadio tumoral o nodal y tipo histológico ⁽¹³²⁾.

Por el contrario, Leong y cols., determinaron la expresión del EGFR (también por técnicas de inmunohistoquímica) y su valor pronóstico en el carcinoma de nasofaringe indiferenciado, en un estudio prospectivo realizado sobre 75

pacientes. Un 82.7% de especímenes mostraron sobreexpresión de EGFR. Encontrando una correlación significativa sólo entre ésta y el tamaño del tumor primario. La edad, sexo, presencia de metástasis en ganglios y metástasis a distancia no se correlacionaban significativamente con la sobreexpresión de EGFR; llegando a la conclusión de que la sobreexpresión de EGFR no afectaba al tiempo libre de enfermedad ni a la supervivencia ⁽¹³³⁾.

En nuestra serie han mostrado sobreexpresión de EGFR por inmunohistoquímica 20 de los 33 (60,6%), resultado que queda alejado de los obtenidos por los distintos autores anteriormente mencionados. Tampoco hemos encontrado, al igual que ellos, correlación con la edad, sexo y recidivas. Sin embargo, en nuestra serie sí observamos que los tumores clasificados como tipo III de la clasificación de la OMS se correlacionan con la sobreexpresión de EGFR ($p=0,070$), además también hemos encontrado correlación entre ésta y la presencia de metástasis ($p=0,044$). Por otro lado, no hemos observado asociación significativa entre la sobreexpresión de EGFR y menor tiempo de recaída.

Intentado aumentar el espectro, hemos estudiado la amplificación del *EGFR* por FISH y sus posibles asociaciones con las variables histológicas mencionadas en los estudios anteriores. Existen pocos estudios acerca del gen *EGFR* y su relación con el CNF. Estudios realizados en otros tipos de tumores como carcinoma de mama o adenocarcinoma de pulmón, sugieren que la amplificación del gen EGFR es un marcador pronóstico importante ^(123, 133, 134). Cho y cols estudiaron la expresión y amplificación de EGFR en 95 casos de carcinoma ductal infiltrante de mama sugiriendo que la amplificación del gen *EGFR* puede estar asociado con un peor pronóstico y evolución clínica ⁽¹³⁴⁾.

Nosotros hemos encontrado amplificación del gen de *EGFR* mediante técnica de FISH, tan sólo en 3 de los 33 casos. No hemos encontrado asociación entre ésta y la edad, sexo y tipo histológico. Sí existe una relación aunque no muy significativa, con el estadiaje según la AJCC/UICC. Tampoco hemos hallado relación significativa con la supervivencia libre de enfermedad, aunque los 3 casos que presentan amplificación del gen tienen una supervivencia libre de enfermedad de 43 meses, frente a los 81 meses de los casos que no presentan amplificación.

También se ha estudiado el valor pronóstico de otros biomarcadores como la oncoproteína p53 y el antígeno ki67, en relación a futuros tratamientos, en el CNF. p53 es una oncoproteína que ha sido bien estudiada en el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello y se ha relacionado con un alto riesgo de recidiva locorregional después de radioterapia y con una peor respuesta a la quimioterapia. Sin embargo, el significado pronóstico de p53 en el CNF es limitado y no se ha encontrado correlación entre la mutación de p53 y el estadio de la enfermedad o la supervivencia ⁽⁸⁷⁾. Por otra parte, se han descrito en la literatura, resultados controvertidos acerca de la sobreexpresión de ki67, un índice de proliferación celular, y su significación pronóstica en el comportamiento tumoral y respuesta al tratamiento de los cánceres de cabeza y cuello incluyendo el CNF ⁽¹³²⁾. Zheng y cols describieron una correlación estadísticamente positiva entre la expresión de ki67 y el estadio de los ganglios linfáticos (N0-N1 vs N2-N3) o de la enfermedad (II vs III-IV) en pacientes con CNF ⁽¹³⁵⁾. Aunque no es estadísticamente significativa, Taheri-Kadkoda Z y cols, en el estudio mencionado

anteriormente, observaron sobreexpresión de ki67 en una proporción alta de pacientes con N2-N3 tamaño de los ganglios >3 cm (132).

Ma y cols, con el propósito de examinar el papel pronóstico de p53 y Ki67 entre otros, realizaron un estudio prospectivo en 87 casos de CNF indiferenciado de la población china y no encontraron una correlación significativa entre estos dos marcadores y un peor pronóstico de la enfermedad ⁽⁸⁷⁾.

En nuestro estudio no hemos encontrado asociación entre p53 y tipo histológico y estadiaje. No obstante, sí hemos observado que existe una relación ($p=0,038$) con la presencia de recidivas, de 11 casos que mostraban expresión de p53 de $\geq 10\%$, 8 recidivaron. En cuanto su asociación con la supervivencia libre de enfermedad, no hemos obtenido resultados significativos, aunque sí hemos observado que los casos que presentan tinción positiva $\geq 10\%$, el tiempo medio de recidiva es de 27 meses, frente a los 69 meses de los casos negativos. Esto nos indicaría que p53 sí podría ser un marcador pronóstico de la enfermedad.

En cambio, respecto al ki67, y coincidiendo con los autores anteriormente mencionados, no hemos encontrado asociación estadísticamente significativa con ninguno de los marcadores pronósticos de la enfermedad.



CONCLUSIONES

- 1.- En la serie estudiada, la incidencia del CNF es mayor en varones que en hembras. En cuanto a la edad, la incidencia es mayor entre los 50-70 años. Estos resultados son similares a los de otras series europeas, pero distintos a los de países donde la enfermedad tiene alta tasa de incidencia.

- 2.- Desde el punto de vista histológico, en la serie estudiada de ámbito andaluz, se advierte que el tipo II (según la clasificación de la OMS) predomina ligeramente sobre el tipo III.

- 3.- Tanto la pérdida de expresión como la delección de p16, así como la sobreexpresión y amplificación de ciclina D1, pueden ser alteraciones genéticas involucradas en la carcinogénesis del tumor ya que están en relación con el ciclo celular y desarrollo del CNF.

- 4.- No se puede afirmar que la amplificación del gen *ciclina D1*, ni la expresión de éste, se asocie a un peor pronóstico del CNF como señalan la mayoría de los autores.

- 5.- La delección de *p16* se asocia a una mayor capacidad de recidiva y puede ser un marcador pronóstico útil, aunque en el presente estudio no llegó a alcanzar niveles de significación estadística.

6.- La amplificación de *EGFR* parece que se correlaciona con la no remisión tras tratamiento, no obstante el número de casos de este estudio es pequeño y se requeriría un estudio más amplio para corroborar esta afirmación.

7.- La sobreexpresión de EGFR en el CNF se relaciona con la presencia de metástasis, pero no afecta al tiempo libre de enfermedad ni a la supervivencia.

8.- La expresión de p53 podría ser un marcador pronóstico de la enfermedad, ya que existe relación entre ésta y la presencia de recidivas.

9.- El índice de proliferación ki67, aún siendo alto en un porcentaje elevado de tumores, no afecta al curso evolutivo de la enfermedad.



BIBLIOGRAFÍA

1. Guerrier y, Charissoux G. L'artère pharyngienne ascendente. Les cah ORL 1981; 16: 805-808
2. Guerrier y, Charachon G. Le pharynx. Données anatomiques. Les cah ORL 1923; 28 43-60
3. Guerrier y, Rouvier P. Anatomie du nez et des fosses nasales. Encycl Med Chir (Paris-France). Oto-Rhino-Laryngologie. 20265 A¹⁰. 4-11-04
4. Kahle W, Leonhardt H, Platzer W. Anatomie, Tome 1. Flammarion Medecine-Science 1990
5. Kahle W, Leonhardt H, Platzer W. Anatomie, Tome 2. Flammarion Medecine-Science. 1990
6. Legent F, Perlemuter I, Vandenbrouck C. Cahiers d'anatomie ORL. Tome 2. Masson. Paris. 1986
7. Loge F, Valdazo A, Courtheoux P, Langeard M. La vascularisation artérielle des fosses nasales. Ann Oto-Laryngol 1984; 101: 199-204
8. Uziel A, Guerrier Y. Physiologie des voix aérodigestives supérieures. Masson. Paris. 1984; pp 99-125
9. Dohlman G, Mattsson O. The role of the cricopharyngeal muscle in cases of hypopharyngeal diverticula: a cineroentgenographic study. Am J Roentgenol Radial Ther Nucl Med 1959; 81:561
10. Hellemans J, Pelemans W, Vantrappen G. Pharyngoesophageal swallowing disorders and the pharyngoesophageal sphincter, Med Clin North Am 1981; 65 : 1149-1171
11. Mosher HP. Xrat study of the movements of the tongue, epiglottis, and hyoid bone in swallowing, followed by a discussion of difficulty in swallowing caused by retropharyngeal diverticulum, postcricoid webs and exostoses of cervical vertebrae. Laryngoscope 1927; 37 : 235
12. Wilson CP. Pharyngeal diverticula, their cause and treatment. J Laryngol Otol 1962; 76 151-180
13. Winans CS. The pharyngeosophageal sphincter in normal human subject. Gastroenterology 1972; 63 : 768-777
14. Wei WI, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma. Lancet 2005; 365:2041-54.

15. Fandi A, Altun M, Azli N, Armand JP, Cvitkovic E. Nasopharyngeal cancer: epidemiology, staging and treatment. *Semin Oncol* 1994; 21:382-97.
16. Boussem H, Bouaouina N, Mokni-Baizig N, Gamoudi A, Chouchane L, Benna F, et al. Carcinomes du nasopharynx. Données actuelles. *Pachol Biol* 2005; 53:45-51.
17. Lee AW, Sze WM, Au JS, Leung SF, Chua DT, Zee BC, et al. Treatment results for nasopharyngeal carcinoma in the modern area: The Hong Kong experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 61:1107-16.
18. Yu MC, Yuan JM. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol* 2002; 12:421-9.
19. Parkin DM, Wheelan S, Ferlay J, Raymond L, Young J. Cancer incidence in five continents. Lyon: IARC 1997;143: 814-5.
20. Chan AT, Teo PM, Huang DP. Pathogenesis and treatment of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Oncol* 2004;31:784-801.
21. Lee JT, Ko CY. Has survival improved for nasopharyngeal carcinoma in the United States. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 132:3003-8.
22. Jmal A, Boussem H, Gara S, Ghanem A, Abaza H, Gara S, et al. Le cancer du nasopharynx de l'enfant en Tunisie : étude rétrospective épidémiologique, clinique et biologique it propos de 48 cas. *Bull Cancer* 2005; 92:977-81.
23. Lee AW, Foo W, Mang O, Sze WM, Chappell R, Lau WH, et al. Changing epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong over a 20-year period (1980-99): an encouraging reduction in both incidence and mortality. *Int J Cancer* 2003; 103:680-5.
24. 1H 1 Gharbi MK, Gritli S. Boussem H, Benna E Ben Abdallah M, El May A, et al. Retrospective study of 2 010 cases of nasopharyngeal carcinoma seen at the institute Salah Azaiz from 1969 to 1988. *Proceedings ASCO* 1996; 15: 197 (American society of Clinical Oncology).
25. Leung TW, Tung SY, Sze WK, Wong FC, Yuen KK, Lui CM, et al. Treatment results of 1 070 patients with nasopharyngeal carcinoma: an analysis of survival and failure patterns. *Head Neck* 2005; 27:555-65.
26. Busson P, Keryer C, Ooka T, Corbex M. EBV-associated nasopharyngeal carcinomas: from epidemiology to virustargeting strategies. *Trends Microbiol* 2004; 12:356-60.

27. Khahir A, Ghorbel A, Daoud J, Frikha M, Drira MM, Laplanche A, et al. Similar BCL-X but different BCL-2 levels in the two age groups of North African nasopharyngeal carcinomas. *Cancer Detec Prev* 2003;27:250-5.
28. Zhang X, Uthaisang W, Hu L, Ernberg IT, Fadeel B. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 promotes stress-induced apoptosis upstream of caspase-2-dependant mitochondrial perturbation. *Int J Cancer* 2005; 113:397-405.
29. Stewart S, Dawson CW, Takada K, Curnow J, Moody CA, Sixbey JW, et al. Epstein-Barr virus-encoded LMP2A regulates viral and cellular gene expression by modulation of the NF-Kappa B transcription factor pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101:15730-5.
30. Toczyski DP, Steitz JA. EAP, a highly conserved cellular protein associated with Epstein-Barr virus small RNAs (EBERs). *EMBO J* 1991; 10:459-66.
31. Decaussin G, Sbih-Lammali F, De Turenne-Tessier M. Expression of BARP1 gene encoded by Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *Cancer Res* 2000; 60: 5584-8.
32. Ng WT, Yau TK, Yung RW, Sze WM, Tsang AH, Law AL, et al. Screening for family members of patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2005; 113:998-1001.
33. Fan H, Nicholls J, Chua D, Chan KH, Sham J, Lee S, et al. Laboratory markers of tumor burden in nasopharyngeal carcinoma: a comparison of viral load and serologic tests for Epstein-Barr virus. *Int J Cancer* 2004; 112:1036-41.
34. Wong TS, Kwong DL, Sham JS, Wei WI, Kwong YL, Yuen AP. Quantitative plasma hypermethylated DNA markers of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:2401-6.
35. Poirier S, Bouvier G, Malaveille C, Ohshima H, Shao YM, Hubert A, et al. Volatile nitrosamine levels and genotoxicity of food samples from high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma before and after nitrosation. *Int J Cancer* 1989; 44: 1088-94.
36. Feng BJ, Huang W, Shugart YY, Lee MK, Zhang F, Xia JC, et al. Genome-wide scan for familial nasopharyngeal carcinoma reveals evidence of linkage to chromosome 4. *Nat Genet* 2002; 31:395-9.

37. Lo KW, Kwong J, Hui AB, Chan SY, To KF, Chan AS, et al. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61:3877-81.
38. Claudio PP, Howard CM, Fu Y, Cinti C, Califano L, Micheli P. et al. Mutations in the retinoblastoma-related gene RB2/p130 in primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2000;60: 8-12.
39. Tao Q, Chan A. Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments. *Expert Rev Mol Med* 2007; May 4;9(12):1-24.
40. Huang DP et al. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Genet cytogenet* 1991; 54: 91-99.
41. Huan DP et al. Cytogenetics of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma xenografts from southern Chinese. *Int J Cancer* 1989; 43: 936-939.
42. Wong et al. Molecular cytogenetic characterization of nasopharyngeal carcinoma cell lines and xenografts by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *Cancer Genet cytogenetic* 2003; 140: 124-132.
43. Lo KW et al. High resolution allelotyping of microdissected primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 3348-3353.
44. Huang DP et al. A region of homozygous deletion on chromosome 9p21-22 in primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* (1994); 54: 4003-4006.
45. Hui AB, Or YY, Takano H, Tsang RK, To KF, Guan XY, Sham JS, Hung KW, Lam CN, van Hasselt CA, Kuo WL, Gray JW, Huang DP, Lo KW. Array-based comparative genomic hybridization analysis identified cyclin D1 as a target oncogene at 11q13.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res*. 2005 Sep 15;65(18):8125-33.
46. Lo KW, Huang DP. Genetic and epigenetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2002 Dec; 12(6):451-62.
47. Lo KW, Cheung ST, Leung SF, van Hasselt A, Tsang YS, Mak KF, Chung YF, Woo JK, Lee JC, Huang DP. Hypermethylation of the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1996; 56: 2721-2723.
48. Kwong J, Lo KW, To KF, Teo PMI, Johnson PJ, Huang DP. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2002; 8: 131-137.
49. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitjian SV, Stockert E, Day III RS, Johnson BE, Skolnick MH, A cell Cycle regulator

- potentielly involved in genesis of many tumours types. *Science* 1994; 264: 436-439.
50. Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* (2000); 60: 3689-3695.
51. Lo KW, Huang DP, Lau KM. *p16* gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1995; 55: 2039-2043.
52. Gulley ML, Nicholls LM, Schneider BG, Amin MB, Ro JY, Geradts J. Nasopharyngeal carcinomas frequently lack the *p16/MTS1* tumour suppressor protein but consistently express the retinoblastoma gene product. *Am J Pathol* 1998; 152:865-869.
53. Chou J, Lin Y-C, Kim J, You L, Xu Z, He B, Jablons DM. Nasopharyngeal carcinoma--review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. *Head & Neck* 2008; *Head Neck*. 2008 Jul; 30(7):946-63.
54. Merlo A, Herman J, Mao L, et al. 50 CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor *p16/CDKN2/MTS1* in human cancers. *Nat Med* 1995; 1: 686–692.
55. Cooper GM, Hausman RE. *The cell: a molecular approach*. 4th ed. Washington DC: ASM Press and Sinauer Associates, Inc.; 2006.
56. Shibosawa E, Tsutsumi K, Koizuka I. Absence of nuclear *p16* from Epstein-Barr virus-associated undifferentiated nasopharyngeal carcinomas. *Laryngoscope* 2000;110:93–97.
57. Lin H-S, Berry GJ, Sun Z, Fee WE Jr. Cyclin D1 and *p16* expression in recurrent nasopharyngeal carcinoma. *World J Surg Oncol* 2006 Sep 5; 4:62.
58. Hwang CF, Cho CL, Huang CC, Wang JS, Shih YL, Su CY, Chang HW. Loss of cyclin D1 and *p16* expression correlates with local recurrence in nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy. *Ann Oncol* 2002; 13:1246-1251.
59. Makitie AA, MacMillan C, Ho J, Shi W, Lee A, O'Sullivan B, Payne D, Pintilie M, Cummings B, Waldron J, Warde P, Irish J, Brown D, Gilbert R, Gullane P, Liu FF, Kamel-Reid S. loss of *p16* expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2177-2184.

60. Wang GL, Lo KW, Tsang KS, Chung NYF, Tsang YS, Cheung ST, Lee JCK, Huang DP. Inhibiting tumourigenic potential by restoration of p16 in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer* 1999; 81:1122-1126.
61. Chow LS, Wang X, Kwong DL, Sham JS, Tsao SW, Nichols JM. Effect of p16INK4a on chemosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Oncol* 2000; 17: 135-140.
62. Qiu GH, Tan LK, Loh KS, Lim CY, Srivastava G, Tsai ST, Tsao SW, Tao Q. The candidate tumor suppressor gene BLU, located at the commonly deleted region 3p21.3, is an E2F-regulated, stress-responsive gene and inactivated by both epigenetic and genetic mechanisms in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene*. 2004 Jun 10;23(27):4793-806.
63. Tao Q, Young LS, Woodman CB, Murray PG. Epstein-Barr virus (EBV) and its associated human cancers--genetics, epigenetics, pathobiology and novel therapeutics. *Front Biosci*. 2006 Sep 1;11:2672-713.
64. Chow LS, Lo KW, Kwong J, To KF, Tsang KS, Lam CW, Dammann R, Huang DP. RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer*. 2004 May 10;109(6):839-47.
65. Catarino RJ, Breda E, Coelho V, Pinto D, Sousa H, Lopes C, Medeiros R. Association of the A870G cyclin D1 gene polymorphism with genetic susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* 2006 Jul; 28(7): 603-608.
66. Sherr CJ. D-type cyclins. *Trends Biochem Sci* 1995;5:187-190.
67. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamazi T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;145:5439-5447.
68. Lee MH, Yang HY. Regulators of G1 cyclin-dependent kinases and cancers. *Cancer Metastasis Rev* 2003; 22:435-449.
69. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; 81:323-330.
70. Callender T, el-Naggar AK, Lee MS, Frankenthaler R, Luna MA, Batsakis JG. PRAD-1 (CCND1/cyclin D1 oncogene amplification in primary resected non-small cell lung cancer 1996;73:294-300.
71. Sgambato A, et al. Cyclin D1 expression in papillary superficial bladder cancer: its association with other cell cycle-associated proteins, cell proliferation and clinical outcome. *Int J Cancer* 2002;97:671-678.

-
72. Zhou B, Elledge S. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000; 408:433-439.
 73. Kerkhoff E, Rapp U. Cell cycle targets of Ras/raf signalling. *Oncogene* 1998;17:1457-1462.
 74. Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Paulette G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, Gornbein JA, Calcaterra TC, Salmón DJ, Wang MB, Srivatsan ES. Cyclin D1 amplification and p16 Δ MTS/CDK1? Deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumours. *Laryngoscope* 2002; 112:472-481.
 75. Kuo MY, Lin CY, Hahn LJ, Cheng SJ, Chiang CP. Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patient with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinomas in Taiwan. *J Oral Pathol Med* 1999; 28:165-169.
 76. Michalides R, van Veelen N, Hart A, Loftus B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1995; 55:975-978.
 77. Vielba R, Arora S, Khana R, Shukla NK, Mathur M, Ralhan R. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 2003; 112:402-408.
 78. Hui AB, Lo KW, Teo PM, To KF, Huang DP. Genome-wide detection of oncogene amplifications in nasopharyngeal carcinoma by array-based comparative genomic hybridation. *Int J Oncol* 2002; 20:467-473.
 79. Porter MJ, Field JK, Leung SF, Lo D, Lee JC, Spandidos DA, van Hasselt CA. The detection of the c-myc and ras oncogenes in nasopharyngeal carcinoma by immunohistochemistry. *Acta Otolaryngol* 1993; 114:105-109.
 80. Leong JL, Loh KS, Putti TC, Goh BC, Tan LK. Epidermal Growth Factor in undifferentiated carcinoma of the nasopharynx. *Laryngoscope* 2004 Jan;114(1):153-157.
 81. Ennis BW, Lippman ME, Dickson RB. The EGF receptor system as a target for antitumor therapy. *Cancer Invest* 1991; 9: 553-562.
 82. Soo R, Putti T, Tao Q, Goh B. Overexpression of cyclooxygenase-2 in nasopharyngeal carcinoma and association with epidermal growth factor receptor expression. *Arch Otol Head Neck Surg* 2005; 68: 538-547.

83. Rodeck U, Jost M, Kari C. EGF-R dependent regulation of keratinocyte survival. *J Cell Sci* 1997; 110:113-121.
84. Mojahedi H, Affleck K, Stubberfield C. EGFR blockade by tyrosine kinase inhibitor or monoclonal antibody inhibits growth, directs terminal differentiation and induces apoptosis in human squamous cell carcinoma HN5. *Int J Oncol* 1998; 13:335-342.
85. Fox SB, Gatter KC, Harris AL. Tumor angiogenesis. *J Pathol* 1996; 179: 232-237.
86. Sheen TS, Huang YT, Chang YL. Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 co-expresses with epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 1285-1292.
87. Ma BB, Poon TC, To KF, Zee B, Mo FK, Chan CM, Ho S, Teo PM, Johnson PJ, Chan AT. Prognostic significance of tumor angiogenesis, ki67, p53 oncoprotein, Epidermal Growth Factor Receptor and Her2 receptor protein expression in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma- A prospective study. *Head Neck* 2003 Oct; 25(10): 864-872.
88. Lu QL, Elia G, Lucas S, Thomas JA. Bcl2 proto-oncogene expression in Epstein-Barr virus associated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* (1993)53: 29-35.
89. Qian CN, Guo X, Cao B, Kort EJ, Lee CC, Chen J, Wang LM, Mai WY, Min HQ, Hong MH, Vande Woude GF, Resau JH, Teh BT. Met protein expression level correlates with survival in patients with late stage nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* (2002); 62: 589-596.
90. Goldsmith DB, West TM, Morton R. HLA associations with nasopharyngeal carcinoma in Southern Chinese: a metaanalysis. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2002; 27:61-7.
91. Mokni-Baizig N, Ayed K, Ayed FB, Ayed S, Sassi F, Ladgham A, et al. Association between HLA-A/-B antigens and -DRB 1 alleles and nasopharyngeal carcinoma in Tunisia. *Oncology* 2001; 61:55-8.
92. Dardari R, Khyatti M, Jouhadi H, Benider A, Ettayehi H, Kahlain A, et al. Study of human leukocyte antigen class I phenotypes in Moroccan patients with nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2001; 92:294-7.
93. Bonfils P, Chevalier JM. In: *Anatomie ORL*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 1998. p. 226-45.
94. Marsot-Duptich K, Meyer B. Le nasopharynx, imagerie normale et pathologique. In: *L'imagerie moderne en ORL. Rapport de la Société*

- française d'oto-rhino-laryngologie et de pathologie cervico-faciale. Paris: Arnette; 1994. p. 263-80.
95. Bourjat P, Kahn JL, Veillon F. Imagerie ORL. In: Doyon D, Monnier L, editors. Cahiers de radiologie. Paris: Masson; 1996. p. 69-85.
96. Marandas P, Marandas N. Cancers du nasopharynx. *Rey Prat* 2000; 50:1556-61.
97. Hsu WM, Wang AG. Nasopharyngeal carcinoma with orbital invasion. *Eye* 2004; 18:833-8.
98. Boussen H, Mebazaa A, Nasr C, Khalfallah S, Gamoudi A, Mezlini A, et al. Dermatomyositis and nasopharyngeal carcinoma. Report of 8 cases and literature review. *Arch Dermatol* 2006; 42:112-3.
99. Mebazaa A, Boussen H, Nouria R, Rokbani L, Ben Osman-Dhahri A, Bouaouina N, et al. Dermatomyositis and malignancy in Tunisia: a multicenter national retrospective study of 20 cases. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48:530-4.
100. Manavis J, Sivridis L, Koukourakis MI. Nasopharyngeal carcinoma: the impact of CT-scan and of MRI on staging, radiotherapy treatment planning, and outcome of the disease. *Clin Imaging* 2005; 29:128-33.
101. Chung NN, Ting LL, Hsu WC, Lui LT, Wang PM. Impact of magnetic resonance imaging versus CT on nasopharyngeal carcinoma: primary tumor target delineation for radiotherapy. *Head Neck* 2004; 26:241-6.
102. Kumar MB, Lu JJ, Loh KS, Chong LM, Soo R, Goh BC, et al. Tailoring distant metastatic imaging for patients with clinically localized undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004; 58:688-93.
103. Chang JT, Chan SC, Yen TC, Liao CT, Lin CY, Lin KJ, et al. Nasopharyngeal carcinoma staging by (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2005; 62:501-7.
104. Mai S, Zong Y, Zhang M, Zhong B, Lin S. Detection of Epstein-Barr virus DNA in plasma/serum. A useful indicator for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Chin Med J (Engl)* 2002; 115:1895-7.
105. Jmal A, Boussen H, Abdennebi M, Gara S, Harzallah L, Gritli S, et al. Cyfra 21 dans les carcinomes indifférenciés du nasopharynx en Tunisie. *Bull Cancer* 2004; 91:369-72.

106. Chan KH, Gu YL, Ng F, Ng PS, Seto WH, Sham JS, et al. EBV specific antibody-based and DNA-based assays in serologic diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer* 2003; 105:706-9.
107. Sobin LH, Wittekind CH. Pharynx. In: *TNM classification of malignant tumors UICC publication*. New York: Wiley-Liss; 2002. p. 27-35.
108. Law CK, Foo W, Lau WH. In-depth evaluation of the AJCC/UICC 1997 staging system of nasopharyngeal carcinoma: prognostic homogeneity and proposed refinements. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2003; 56:413-26.
109. Gurkaynak M, Cengiz M, Akyurek S, Ozyar E, Atahan IL, Tekuzman G. Waldeyer's ring lymphomas: treatment results and prognostic factors. *Am J Clin Oncol* 2003; 26:437-40.
110. Cansiz H, Guvenc MG, Sekercioglu N. Surgical approaches to juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *J Craniomaxillofac Surg* 2006; 34:3-8.
111. Raney RB, Meza J, Anderson JR, Fryer CJ, Donaldson SS, Breneman JC, et al. Treatment of children and adolescents with localized parameningeal sarcoma: experience of the Intergroup Rhabdomyosarcoma Study Group protocols IRS-II through-IV, 1978-1997. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38: 22-32.
112. Mekni A, Bouraoui S, Amdouni N, Haifa TG, Kchir N, Zitouna M, et al. Arare tumor of the rhinopharynx. *Ann Pathol* 2004; 24:375-6.
113. Morales-Angulo C, Megía-López R, Rubio-Suarez A, Rivera-Herrero F, Rama J. Carcinoma of the nasopharynx in Cantabria. *Acta Otorrinolaringol Esp* 1999 Jun-Jul; 50 (5): 381-386.
114. Burt RD, Vaughan TL, McKnight B. Descriptive epidemiology and survival analysis of nasopharyngeal carcinoma in the United States. *Int J Cancer* 1992; 52:549-546.
115. d'Espiney Amaro C, Montalvão P, Henriques P, Magalhães M, Olias J. Nasopharyngeal carcinoma: our experience. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009 Jun;266(6):833-8. Epub 2008 Oct 2.
116. Nesić V, Sipetić S, Vlajinac H, Miljus D, Stosić-Divjak S, Jesić S. Incidence of nasopharyngeal carcinoma in Belgrade during the period 1991-2005. *Vojnosanit Pregl*. 2009 Jun;66(6):473-6.
117. Chan JKC, Bray F, McCarron P, et al. Nasopharyngeal carcinoma. In: Barnes, L., Eveson, J.W., Reichart, P., Sidransky, D.: *Pathology and genetics of head and neck tumours*. World Health Organization Classification of Tumours, Lyon 2005; 85-97.

118. Sham JS, COI D. Prognostic factors of nasopharyngeal carcinoma: a review of 759 patients. *Br J Radiol* 1990;63:51-58.
119. Cheng SH, Jian JJ, Tsai SY. Long-term survival of nasopharyngeal carcinoma following concomitant radiotherapy and chemotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2000; 48: 1323-1330.
120. Dessy E, Rossi E, Berenzi A, Tironi A, Benetti A, Grigolato P. Chromosome 9 instability and alterations of p16 gene in squamous cell carcinoma of the lung and in adjacent normal bronchi: FISH and immunohistochemical study. *Histopathology* 2008; 52: 475-482.
121. Gautschi O, Ratschiller D, Gugger M, Betticher DC, Heighway J. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: A key driver of malignant transformation. *Lung Cancer* 2007; 55: 1-14.
122. Gallegos Ruiz MI, Floor K, Vos W, Grünberg K, Meijer GA, Rodríguez JA, Giaccone G. Epidermal growth factor (EGFR) gene copy number detection in non-small cell lung cancer; a comparison of fluorescence in situ hybridization and chromogenic in situ hybridization. *Histopathology* 2007; 51: 631-637.
123. El-Zammar OA, Zhang S, Katzenstein AL. Comparison of FISH, PCR and immunohistochemistry in assessing EGFR status in lung adenocarcinoma and correlation with clinicopathologic features. *Diagn Mol Pathol* 2009 Sep; 18(3): 133-137.
124. Okami K, Reed AL, Cairns P, Koch WM, Westra WH, Wehage S, Jen J, Sidransky D. Cyclin D1 amplification is independent of p16 inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 1999; 18: 3541-3545.
125. Vielba R, Bilbao J, Ispizua A, y cols. p53 and cyclin D1 as prognostic factors in squamous cell carcinoma of the larynx. *Laryngoscope* 2003, 113: 167-172.
126. Hwang Cf, Cho CL, Huang CC, y cols. Loss of cyclin D1 and p16 expression correlates with local recurrence in nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy. *Ann Oncol* 2002, 13: 1246-1251.
127. Makitie AA, MacMillan C, Ho J, y cols. Loss of p16 expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003, 9:2177-2184.

128. Sailasree R, Abhilash A, Sathyan KM, Nalinakumari KR, Thomas S, Kannan S. Differential roles of p16^{INK4A} and p14^{ARF} genes in prognosis of oral carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008 Feb; 17(2): 414-420.
129. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, Kowalski D, Harigopal M, Sasaki C, Rimm DL, Psyrri A. Prognostic significance of p16 protein level in oropharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004 Sep; 10: 5684-5691.
130. König F, Krekeler G, Hönig JF, Cordon-Cardo C, Fischer G, Korabiowska K. Relation between human Papillomavirus positivity and p16 expression in head and neck carcinomas- A tissue microarray study. *Anticancer Res* 2007; 27: 283-288.
131. Putti TC, To KF, Hsu HC, Chan ATC; Lai GM, Tse G, Lee YS, Whang-Peng J, Millward M, Lin L, Lin X, Lee CS. Expression of epidermal growth factor receptor in head and neck cancers correlates with clinical progression: a multicentre immunohistochemical study in the Asia-Pacific region. *Histopathology* 2002; 41: 144-151.
132. Taheri-Kadkhoda Z, Magnusson B, Svensson M, Mercke C, Björk-Eriksson T. Expression modes and clinical manifestations of latent membrane protein 1, ki-67, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor in nonendemic nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck* 2009 Apr; 31(4):482-92.
133. Leong JL, Loh KS, Putti TC, Goh BC, Tan LK. Epidermal growth factor receptor in undifferentiated carcinoma of the nasopharynx. *Laryngoscope*. 2004 Jan;114(1):153-7.
134. Cho E, Choi Y-L, Han JJ, Kim K-M, Oh YL. Expression and amplification of Her2, EGFR and cyclin D1 in breast cancer: Immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridation. *Path Int* 2008; 58: 17-25.
135. Zheng X, Hu L, Chen F, Christensson B. Expression of ki67 antigen, Epidermal Growth Factor Receptor and Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein (LMP1) in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30B: 290-295.