



FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE CITOLOGÍA E HISTOLOGÍA NORMAL Y PATOLÓGICA

**ESTUDIO ETIOPATOGENÉTICO DEL LINFOEPITELIOMA NO  
ENDÉMICO**

**Fernando Gabriel Casco**  
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 Departamento de Citología e Histología Normal y Patológica, se ha realizado el trabajo titulado: **“ESTUDIO ETIOPATOGENICO DEL LINFOEPITELIOMA NO ENDÉMICO”** PRESENTADO POR Don **Fernando Gabriel Casco** para optar al grado de Doctor en Medicina.

Sevilla, 31 de mayo de 2010



## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Prof. Dr. Hugo Galera Davidson, por la confianza depositada en mí al haberme facilitado la venida a España y por su constante labor de dirección, asesoramiento, apoyo y estímulo en los años que hemos trabajado juntos.**

**Al Prof. Dr. Hugo Galera Ruiz, por su labor de dirección y por los aportes al conocimiento desde su especialidad.**

**Al Prof. Dr. Manuel de Miguel Rodríguez, por su labor de dirección y por la paciente tarea de corrección de este trabajo.**

**A los Profs. Dres. Ricardo Drut y Carlos Bacci, por su aporte desinteresado de casos provenientes de Argentina y Brasil.**

**A la Prof. Dra. Concepción Otal Salaverri, por su ayuda inicial en la búsqueda de casos del Hospital Universitario Virgen Macarena.**

**A María de los Angeles Aragón Román, por su inmejorable labor técnica.**



**A mi madre  
A mi hermano  
y a todos aquellos que directa o indirectamente han sabido  
sostenerme durante la realización de este trabajo.**





# ÍNDICE

---



<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>17</b>
<b>A.- ANATOMIA DE LA FARINGE.....</b>	<b>19</b>
1.- Topografía.....	19
a) Rinofaringe (cavum, nasofaringe, epifaringe) .....	19
b) Orofaringe (mesofaringe) .....	21
c) Hipofaringe .....	21
2.- Estructura.....	22
a) Epitelio faríngeo .....	22
b) Elementos linfóides .....	22
c) Musculatura faríngea.....	24
d) Hiato y puntos débiles.....	27
3.- Relaciones.....	28
4.- Vascularización e inervación.....	29
a) Vascularización.....	29
b) Inervación.....	31
<b>B.- CARCINOMA DE LA NASOFARINGE.....</b>	<b>31</b>
1.- Epidemiología.....	32
a) Incidencia.....	32
b) Distribución por edad y sexo.....	34
c) Distribución histológica.....	34
2.- Etiología.....	35
a) Virus de Epstein Barr.....	35

b) Factores ambientales.....	40
c) Anomalías genéticas.....	41
d) Tipo HLA.....	44
3.- Morfología del CNF.....	45
a) Generalidades de la Nasofaringe.....	45
b) Clasificación de los CNF.....	48
c) Extensión tumoral.....	51
4.- Técnicas moleculares para la detección del VEB.....	52
a) Hibridación <i>in situ</i> (ISH).....	54
b) Southern Blot.....	55
c) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	55
d) Carga vírica del VEB.....	56
e) Técnicas inmunohistoquímicas (IHQ).....	59
f) Serología.....	59
5.- Presencia del VEB en otras neoplasias.....	62
a) Otros carcinomas similares al linfoepitelioma.....	62
b) Neoplasias linfoides.....	62
6.- Diagnóstico del CNF.....	65
a) Signos clínicos.....	65
b) Exploración física.....	67
c) Estudios complementarios.....	70
7.- Clasificación anatomoclínica del CNF.....	74
8.- Formas clínicas del CNF.....	76
a) Infantil.....	76

b) Adulto.....	76
c) Localizada.....	76
d) Metastásica.....	77
9.- Diagnóstico diferencial del CNF .....	77
a) Linfomas.....	77
b) Tumores de tejidos blandos.....	78
c) Melanomas.....	79
d) Adenocarcinomas.....	79
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA.....</b>	<b>81</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>85</b>
<b>A.- MATERIAL.....</b>	<b>87</b>
<b>B.- MÉTODOS.....</b>	<b>89</b>
1.- Estudio histológico.....	89
2.- Estudio por <i>hibridación in situ</i> .....	89
3- Estudio inmunohistoquímico.....	91
4.- Método estadístico.....	93
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>95</b>
A.- Procedencia y datos clínicos de los pacientes.....	97
B.- Características histológicas.....	101
C.- ISH en Carcinoma Nasofaríngeo.....	106

D.- Otros parámetros inmunohistoquímicos.....	111
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>117</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>127</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>133</b>

## **ABREVIATURAS**

**ADN:** Acido desoxirribonucléico.

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

**ARN:** Acido desoxirribonucléico.

**C3-C4:** Vértebras cervicales 3° y 4°.

**CNF:** Carcinoma nasofaríngeo.

**CNFTI:** Carcinoma nasofaríngeo tipo indiferenciado.

**EA:** Antígeno precoz.

**EBER:** ARN no codificante del VEB.

**EBNA:** Antígeno nuclear del VEB.

**ELISA:** Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas.

**EMA:** Antígeno de membrana epitelial.

**FRBL:** Faringe retrobasilingual.

**H-E:** Hematoxilina eosina.

**HE:** Hospital Europeo.

**HGC:** Hibridación genómica comparada.

**HLA:** Hospital Latinoamericano.

**HLA:** Antígeno leucocitario humano.

**HRS:** Célula de Reed Sternberg.

**IF:** Inmunofluorescencia.

**Ig:** Inmunoglobulina.

**IR:** Región interna del genoma viral.

**ISH:** Hibridación in situ.

**LB:** Linfoma de Burkitt.

**LH:** Linfoma de Hodgkin.

**LMP:** Proteína latente de membrana.

**LNH:** Linfoma no Hodgkin.

**N:** Ganglio linfático (Clasificación TNM).  
**NDM:** Nitrosodimetinamina.  
**NPIP:** N-nitrospiperidina.  
**NPYR:** N-nitrospirrolidina.  
**OMS:** Organización Mundial de la Salud.  
**PCR:** Reacción en cadena de polimerasa.  
**PET:** Tomografía por emisión de positrones.  
**RM:** Resonancia magnética.  
**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia adquirida.  
**SLPT:** Síndrome linfoproliferativo post trasplante.  
**T:** Tumor (Clasificación TNM).  
**TC:** Tomografía computada.  
**TR:** Región terminal del genoma viral.  
**VCA:** Antígeno de la cápside viral.  
**VEB:** Virus de Epstein Barr.  
**VF:** Velofaringe.  
**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana.  
**ZEBRA:** Activador Z de la replicación.



# **I. 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 <sup>(1-7)</sup>.

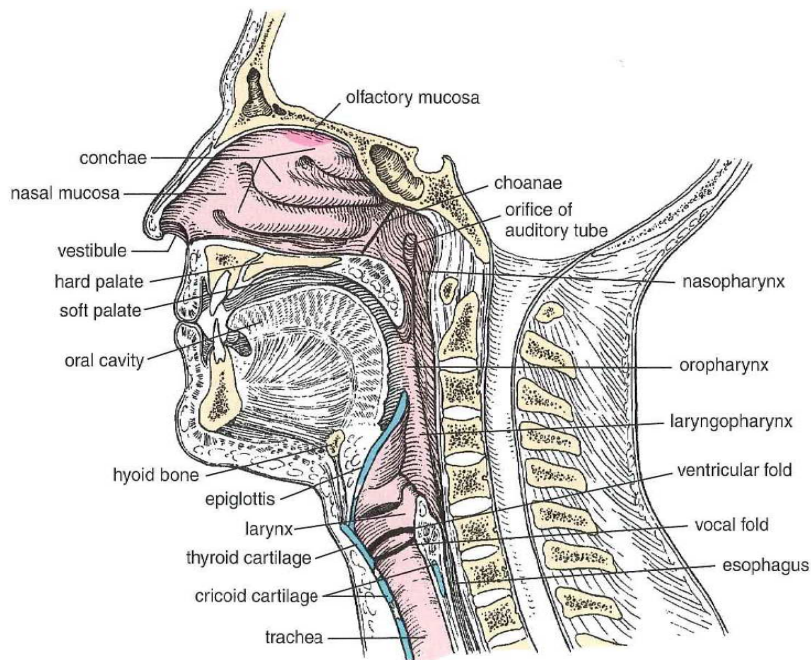
### **1. Topografía**

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**, pág. 20):

#### **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 suprahiodea 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 suprahiodea, desempeñando un papel esencial en la deglución <sup>(8)</sup>.

**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 un 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.

#### **■ 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 homólogos 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.

#### ■ 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 aritenopiglótico, 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.

#### **d) 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 <sup>(9-13)</sup>. 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 glosofaríngeo, 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 glosofaríngeo 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 carcinoma 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 <sup>(14)</sup>.

El tumor maligno 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 <sup>(14, 15,16)</sup>.

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) <sup>(15-18)</sup>. 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 <sup>(17-19)</sup>.

El perfil del CNF es parecido a del cáncer evolutivo con un potencial metastásico visceral elevado (hueso, pulmones, hígado), que es la causa principal de fracaso terapéutico <sup>(15, 16, 17,20)</sup>.

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

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) <sup>(14, 15, 16,17, 20)</sup>.

## **1. Epidemiología**

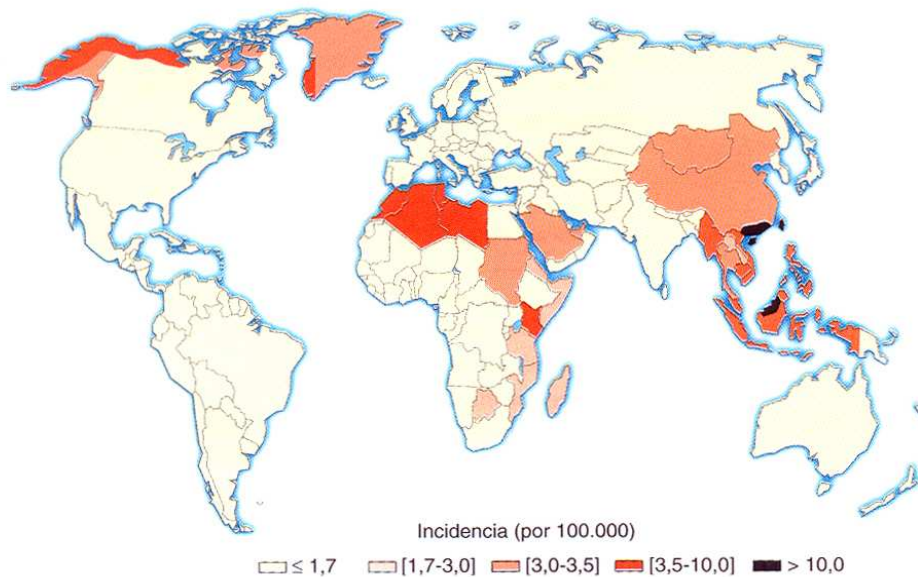
### **a) Incidencia**

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, endémico en los países de la cuenca mediterránea y del Magreb, y sobre todo en el sudeste asiático <sup>(16-21)</sup> (**Fig. 2**, pág. 33). En esta última región, la incidencia varía de 20 a 50/100.000, siendo máxima en el sudeste de China (Kwangtung) y en Hong Kong <sup>(17-20)</sup>, 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 <sup>(19, 20)</sup>.

En las zonas donde la frecuencia es intermedia (Magreb y países del entorno mediterráneo), la incidencia varía de 3 a 7/100.000 <sup>(17, 18, 19, 20, 21, 22)</sup>.



**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 <sup>(21)</sup>.

## **b) Distribución por edad y sexo**

El promedio de edad y 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 <sup>(18, 20, 23)</sup>. En las series asiáticas, el promedio de edad de aparición suele ser de 50 años (**Tabla 1**, pág. 35). 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 <sup>(22, 24)</sup>. En Túnez, los casos pediátricos detectados antes de los 18 años representan alrededor del 5% de los carcinomas nasofaríngeos, y el tumor maligno epitelial es el más frecuente en oncología pediátrica <sup>(22)</sup>. 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 <sup>(8)</sup>.

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

## **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 1** abajo) en las zonas de incidencia alta o intermedia, donde representa alrededor del 80-99% de los casos <sup>(14, 16, 24)</sup>. En Estados Unidos, la frecuencia de las formas epidermoides bien diferenciadas puede llegar hasta el 70% según Lee y cols <sup>(8)</sup>.

## 2. Etiología

### a) Virus de Epstein-Barr

Las infecciones por el virus de Epstein-Barr (VEB) son una de las etiologías principales del CNF <sup>(26)</sup>. 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 1**

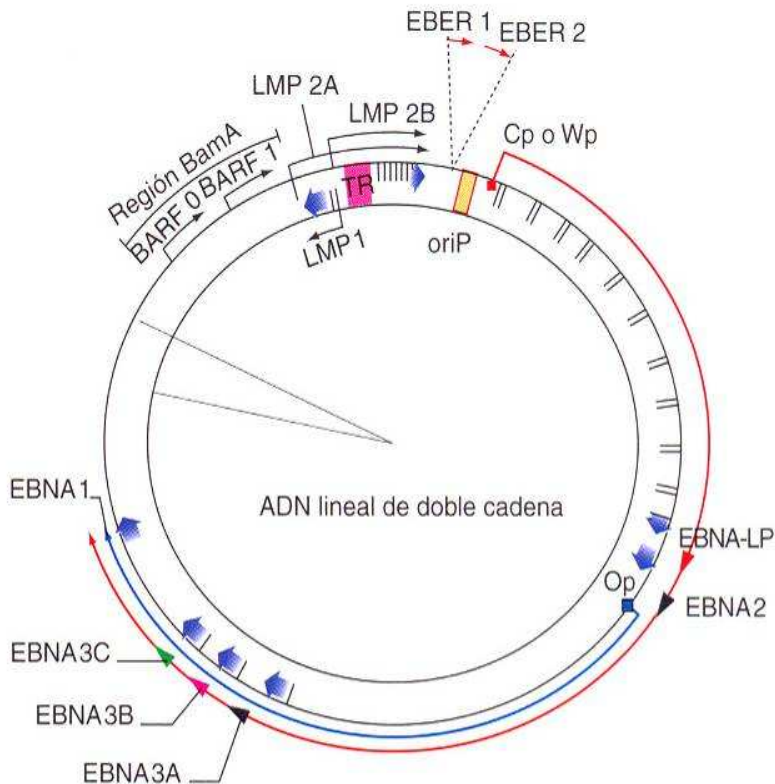
Perfil epidemiológico de los carcinomas de la nasofaringe.

Autor/Referencia	Gharbi <sup>(24)</sup>	Lee <sup>(21)</sup>	Leung <sup>(25)</sup>
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 esquema se muestra en la **Figura 3** (pág. 37). 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. De los cien genes que contiene, sólo se expresan algunos.

El ciclo del VEB presenta dos fases, latente y replicativa <sup>(26, 27)</sup>. 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 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.



**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.

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 la **Tabla 2** (pág. 40).

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 esta neoplasia al mantener el genoma viral en el estado episómico en varias copias <sup>(27)</sup>. 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 apoptósica (o muerte celular programada), en un punto anterior a la activación de la caspasa 2 <sup>(28)</sup>. 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 <sup>(29)</sup>. 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 <sup>(30)</sup>. El transcrito BARF1 suele detectarse en las células de CNF <sup>(31)</sup>, 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 carcinomas *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 <sup>(14, 26, 27)</sup>. 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 2**, pág. 40) <sup>(26)</sup> 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  LMA (o gp)	Núcleo Citoplasma  Membranas celulares + cubierta	Proteína estructural (cápside)  Proteína estructural (membrana)

## b) Factores ambientales

Varios datos epidemiológicos y experimentales sugieren la participación de factores dietéticos en la etiología de los CNFTI. 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<sup>(35, 65)</sup>.

Otros factores pueden contribuir al desarrollo de esta neoplasia, como agentes contaminantes (Ej. el níquel) que han sido apuntados por Wu y cols<sup>(67)</sup>. En un estudio reciente sobre los factores ocupacionales como



materiales de la construcción y la exposición a metales, residuos de madera, combustibles y gases de motores, pinturas y barnices, sólo la exposición a residuos de madera ha sido estadísticamente significativa (68).

A diferencia de otros tumores cérvico faciales, el consumo de tabaco parece tener menor importancia en el desarrollo del CNF (15, 18, 20).

### **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 <sup>(20)</sup>. 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 <sup>(38)</sup>.

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, en el estudio de Feng y cols <sup>(36)</sup>, 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 <sup>(103, 104, 105)</sup>. Posteriormente, se utilizó el cariotipo para caracterizar las alteraciones cromosómicas en las líneas celulares del CNF <sup>(106)</sup>. Análisis de microsatélites también revelaron varias regiones con desequilibrios alélicos en tumores primarios <sup>(107, 108)</sup>. 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 la 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 <sup>(109)</sup>.

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 <sup>(103)</sup>.

Aunque en el CNF algunas alteraciones de genes supresores de tumores bien conocidas (como TP53, que codifica 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 3** resume las alteraciones genéticas más comunes detectadas en el CNF.

**Tabla 3. Alteraciones genéticas detectadas por análisis de marcadores de microsatélite e hibridación genómica comparada en líneas celulares de CNF y tumores primarios**  
(103)

<b>Cromosoma</b>	<b>Delecciones</b>	<b>Amplificaciones</b>
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

#### **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 (39, 40, 41). 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.

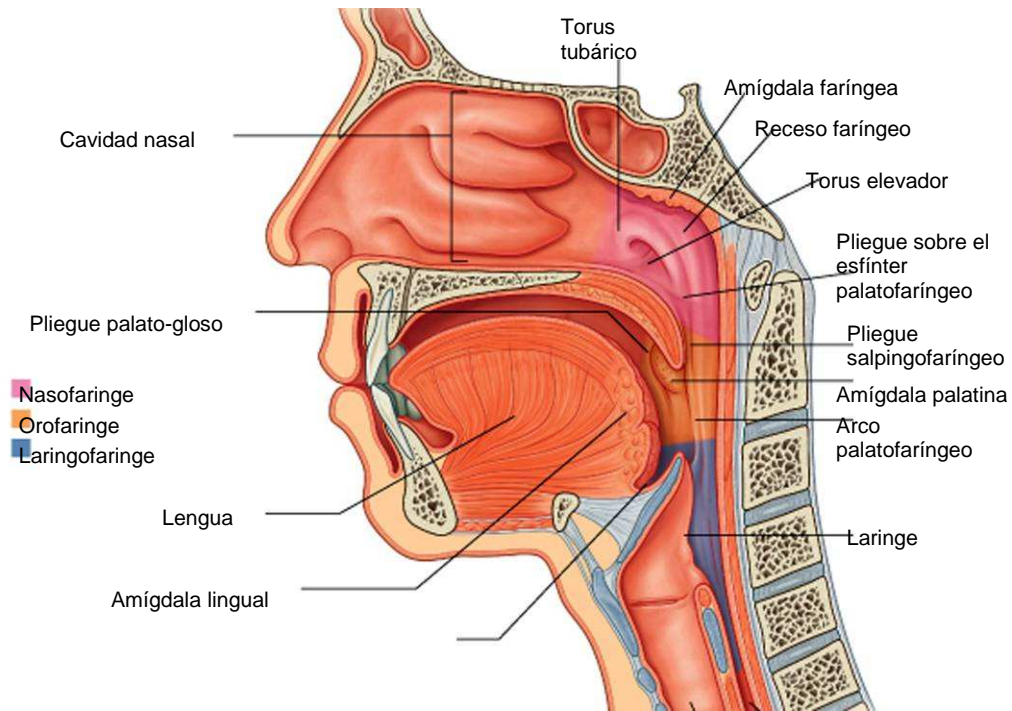
### 3. Morfología del CNF

#### 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. 4**, pág. 46). 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 <sup>(42, 43, 44)</sup>.

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 4.-** 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 media, 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 con 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 cubierta epitelial se apoya directamente en el tejido linfoide. Las células tumorales son de estirpe 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 <sup>(14, 15, 16)</sup>. 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 técnicas 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 1**, pág. 35). 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 sarcomatoide 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 paraselar. 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 <sup>(17, 18)</sup>. 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 <sup>(17, 18, 19)</sup>.

#### **4. Técnicas moleculares para la detección del VEB**

La detección del VEB puede abordarse desde distintos enfoques (**Tabla 4**, pág. 53), pero los avances más importantes en los últimos años han sido debidos al análisis molecular de los ácidos nucleicos <sup>(14, 15, 16)</sup>. En tejidos, la detección molecular de RNA derivados del VEB mediante hibridación *in situ* se considera la técnica de referencia para determinar si las lesiones histopatológicas contienen el virus. La hibridación *in situ* de EBER y la inmunohistoquímica de LMP1 son las técnicas rutinarias para detectar la infección latente por VEB en los tejidos <sup>(24)</sup>.

La carga vírica del VEB en sangre se considera actualmente una técnica de gran valor para la evaluación clínica de los pacientes con riesgo de adquisición de una neoplasia asociada a este virus <sup>(26)</sup>.

**Tabla 4.** Técnicas para la detección del VEB.

TÉCNICA	UTILIDAD
Hibridación <i>in situ</i>	Identificación de RNA EBER o DNA del VEB en tipos celulares específicos con lesiones histológicas.
Ensayo de clonalidad del VEB mediante análisis por <i>southern blot</i>	Evaluación de la clonalidad de las lesiones con respecto a la estructura del DNA del VEB. Diferenciar la infección latente de la replicativa basándose en la estructura del genoma.
Amplificación del DNA del VEB	Detección de DNA viral en tejidos.
Carga vírica del VEB	Cuantificación de DNA del VEB en sangre o fluidos corporales para monitorizar la enfermedad a lo largo del tiempo.
Inmunohistoquímica (LMP1 y 2A, EBNA 1 y 2)	Identificación de las proteínas de expresión del VEB en tipos celulares específicos y con lesiones histológicas.
Microscopía electrónica	Identificación de viriones completos presentes en la infección lítica. No es práctico para uso habitual.
Serología (anticuerpos frente al VCA, EBNA, EA y heterófilos)	Medir la respuesta de anticuerpos a las proteínas víricas. Permite distinguir entre infección aguda y crónica.
Cultivo de VEB o de linfocitos B infectados por VEB	Detección y medición semicuantitativa de los viriones infecciosos. No es práctico para uso rutinario. Prueba compleja, laboriosa y de escaso coste-beneficio.

### **a) Hibridación *in situ* (ISH)**

Es una técnica de referencia para detectar la infección latente del VEB en los tejidos. También puede aplicarse en tejidos parafinados y preparaciones citológicas <sup>(31)</sup>. Actualmente, los protocolos para hibridación de los EBER utilizan distintas sondas: oligonucleótidos para DNA, sondas para RNA (ribosondas) y sondas para ácidos nucleicos. Estas sondas pueden estar marcadas con biotina, digoxigenina, fluoresceína, etc. Aunque la transcripción de los EBER es abundante en las células con infección latente, pueden darse resultados falsos negativos por la degradación del RNA. La utilización de controles de hibridación disminuye este problema. En la práctica, la detección de DNA del virus es poco utilizada, excepto en situaciones en las que el RNA esté degradado; en estos casos se emplean sondas dirigidas contra la secuencia *BamHIW*, una región repetida del genoma del virus que permite una mayor sensibilidad en la detección cualitativa del virus.

En general, en todas las células neoplásicas asociadas al VEB, incluyendo carcinomas, sarcomas y linfomas se observa positividad para los EBER, mientras que éstos están ausentes en las células normales adyacentes <sup>(36,45)</sup>. Una vez identificado el tumor en el paciente y su asociación con el virus, los EBER pueden usarse como marcadores de recurrencia de la enfermedad.

### **b) Southern blot**

El análisis por *southern blot* se utiliza para determinar la clonalidad de los tejidos infectados por el VEB con respecto a la estructura del genoma vírico <sup>(55)</sup>. La técnica se basa en la presencia de un número variable de secuencias de repetición terminales presentes en el extremo de cada molécula de DNA lineal. En las células infectadas, los extremos TR del genoma se unen para formar el episoma. Para realizar esta prueba, el DNA de la zona de la lesión se digiere con enzimas de restricción. Después de la electroforesis y transferencia, se añade una sonda marcada para detectar los fragmentos que contienen las zonas terminales repetidas. Los patrones de bandas que se observan en la electroforesis pueden ser monoclonales, oligoclonales y policlonales. En los tumores monoclonales se detecta una única banda de elevado peso molecular, mientras que en los policlonales se observan varias bandas. En los pacientes inmunodeprimidos los tumores oligoclonales y policlonales tienen mejor pronóstico <sup>(51)</sup>.

### **c) Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La amplificación por PCR de zonas conservadas del genoma del VEB para detectar la infección vírica en diversas muestras clínicas como tejidos, sangre, saliva, etc. ha sido empleada desde hace algún tiempo para relacionar esta infección con diversas situaciones clínicas. Sin embargo, se ha observado la presencia de DNA del VEB en linfocitos de

individuos sanos, por lo que la detección cualitativa del virus en sangre no permite distinguir entre infección crónica y reactivación. La cuantificación del DNA se muestra como una técnica más útil. En tejidos la situación es similar, por ello se utiliza la hibridación *in situ* de los EBER en lugar de la amplificación mediante PCR para detectar las lesiones asociadas al VEB en las muestras de biopsia. Una excepción significativa a todo esto sería la detección cualitativa del DNA del VEB en líquido cefalorraquídeo en pacientes con SIDA, que es indicativa del linfoma primario del sistema nervioso central y no requiere la confirmación del diagnóstico con biopsia cerebral. La desaparición del DNA del virus en esta muestra biológica tras el tratamiento se asocia con una buena evolución del linfoma.

#### **d) Carga vírica del VEB**

La determinación de la carga vírica del VEB (cuantificación del DNA del virus) tiene gran utilidad por sí sola, aunque debe combinarse con parámetros clínicos y otras técnicas de laboratorio adicionales. En los receptores de trasplante, la detección cualitativa del VEB generalmente no se correlaciona con la presencia de Síndromes Linfoproliferativos Post Trasplante (SLPT), dado que el virus puede detectarse en la sangre periférica de individuos infectados sanos en bajos niveles. En cambio, los ensayos cuantitativos permiten observar las fluctuaciones de la carga vírica en el desarrollo y regresión de esta enfermedad. Actualmente, la forma más común de determinar la carga vírica del VEB se basa en pruebas de PCR.



Inicialmente estos métodos fueron semicuantitativos y su mayor desventaja radicaba en la escasa estandarización de la metodología y la posibilidad de obtención de resultados falsos negativos por factores de inhibición de la PCR presentes en las muestras biológicas.

Posteriormente, los métodos cuantitativos competitivos de PCR mejoraron la determinación de la carga vírica del VEB. La inclusión de calibradores internos para cada reacción permitió identificar los problemas de inhibición. Aunque estos ensayos de carga vírica son reproducibles y precisos, son laboriosos, requieren una elevada manipulación durante y después de la PCR y precisan gran número de cálculos para la obtención de los resultados.

Este hecho no permite el procesamiento de un elevado número de muestras y dificulta el seguimiento de un gran número de pacientes. En cambio, la PCR cuantitativa en tiempo real, al detectar durante la amplificación la fluorescencia de los productos de PCR, requiere poca manipulación y permite el seguimiento de un mayor número de pacientes y muestras.

La gran variedad de técnicas empleadas y las diferentes dianas del genoma del VEB usadas hacen complicada la comparación de los resultados de los estudios. El tipo de ensayo de PCR empleado (por ej.

semicuantitativo, cuantitativo competitivo o en tiempo real) y el método usado para la detección de los productos de amplificación (v. g., gel de agarosa, ensayo de enzimas, análisis de *southern blot*, etc.) puede influir en el resultado, precisión y reproducibilidad de la determinación de la carga vírica de VEB. Así, mediante PCR en tiempo real se obtienen, generalmente, cargas víricas de VEB más altas que las obtenidas con los métodos semicuantitativos y cuantitativos competitivos.

Otro aspecto muy importante se refiere a la selección de la muestra más adecuada. Actualmente, se utilizan varios tipos de muestras para los ensayos de cuantificación de DNA de VEB. Éstas incluyen la sangre total, células de sangre periférica, suero y plasma. El aislamiento de células sanguíneas es laborioso, requiere bastante cantidad de sangre y el proceso puede dañar las células. En cambio, la utilización de sangre total requiere poco volumen de muestra, siendo un argumento de peso para el seguimiento de niños y pacientes graves. Además, no requiere pasos previos a la extracción del DNA. Los niveles de carga vírica hallados en las células de sangre periférica y en sangre total, son generalmente más elevados que los hallados en plasma. La carga vírica asociada a las células sanguíneas puede persistir a elevados niveles, pero no acompañarse con la detección en plasma, o detectarse a valores bajos. No obstante, la presencia de DNA del VEB en plasma indicaría una reactivación de la infección por lo que no se detectaría en individuos sanos seropositivos para VEB.

### **e) Técnicas de Inmunohistoquímica**

Existen anticuerpos comerciales para la detección de LMP-1, EBNA-1, EBNA-2. Algunos de estos antígenos se pueden detectar en tejidos procesados de forma rutinaria (fijados en formol e incluidos en parafina). Este método permite identificar a la célula infectada y valorar la expresión de los productos del VEB en la población de células tumorales.

### **f) Serología**

La determinación de anticuerpos frente al VEB es de gran utilidad en los pacientes inmuno competentes para el diagnóstico de la fase aguda y crónica. Se emplean anticuerpos dirigidos contra distintos antígenos expresados durante el ciclo lítico o de latencia para distinguir las diferentes fases de la infección (**Tabla 5**, pág. 60). En los pacientes inmuno deprimidos, la interpretación de los resultados serológicos para el diagnóstico de reactivación es difícil y compleja, debido a la escasa o nula producción de anticuerpos. En los pacientes con tumores asociados al VEB se observa una elevación de los niveles de anticuerpos IgG anti-EA y anti-VCA, con disminución de anti-EBNA. Sin embargo, este patrón no es uniforme <sup>(25, 26)</sup>. Así, los pacientes con carcinoma nasofaríngeo, una forma de neoplasia muy frecuente en ciertas regiones de China, poseen niveles elevados de varios antígenos víricos, especialmente de IgA anti-VCA <sup>(32)</sup>. Por ello, se considera que la serología no es útil para el diagnóstico y se recomienda el empleo de otras técnicas, como la

detección de DNA del VEB mediante carga vírica para evaluar las reactivaciones en pacientes inmuno deprimidos y correlacionar los resultados con las manifestaciones clínicas.

**Tabla 5.** Marcadores serológicos de la infección por el VEB.

	IgM VCA	IgG anti-VCA	IgG anti-EA	IgG anti EBNA
No infectados	-	-	-	-
Primoinfección	+	+	+/-	-
Infección pasada	-	+	+/-	++
Reactivación	+/-	++	++	+/-

Los perfiles serológicos en caso de enfermedad benigna o maligna relacionada con el VEB se muestran en la **Tabla 6**.

**Tabla 6:** 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 <sup>(14, 26, 27)</sup>.

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 <sup>(32)</sup>. 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 <sup>(33)</sup>. 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 CNFTI <sup>(34)</sup>.

## **5. Presencia del VEB en otras neoplasias**

### **a) Otros carcinomas similares al linfocarcinoma**

Existen tumores que se presentan en otras localizaciones no nasofaríngeas con idéntica morfología que el CNF indiferenciado, algunos de los cuales se asocian al VEB. Se han descrito casos asociados al VEB en estómago, glándula salival, pulmón, y timo. También ha sido descrita la asociación al VEB, aunque más raramente, en algunos casos de carcinoma linfocarcinoma-like de cavidad oral, tráquea y laringe. En cambio, el VEB no ha sido detectado en casos localizados en piel, cérvix uterino, vagina y vejiga urinaria

### **b) Neoplasias linfoides**

#### Linfoma de Burkitt (LB)

La mayoría de los casos de LB endémico se asocian al VEB. Sin embargo, en las áreas no endémicas sólo el 20% de los casos están asociados. Por lo tanto, el VEB no es un factor ni necesario ni suficiente para el desarrollo de este linfoma. Las células neoplásicas del LB asociado al VEB sólo expresan EBNA1 y EBERs; es decir, expresan un patrón de latencia tipo I. El VEB en el LB es de carácter clonal. El mecanismo patogénico del VEB podría estar relacionado

con la capacidad de EBNA1 para activar los genes RAG1 y RAG2, lo que aumentaría la posibilidad de producirse la translocación característica que activa el oncogen *c-myc*. La malaria, en los casos endémicos, sería un factor facilitador ya que al disminuir la actividad inmunosupresora de las células T, posibilita la expansión de clones de células B infectadas por el VEB <sup>(58, 67, 89)</sup>.

### Linfoma de Hodgkin (LH)

En el 40-70% de los casos de LH clásico, las células HRS expresan EBERs. En el LH tipo predominio linfocítico sólo se detecta expresión de EBERs en el 0-20%. El VEB en los casos de LH asociado es de carácter clonal. Además de EBERs, en el LH las células neoplásicas expresan EBNA1, LMP-1 y LMP-2; es decir, muestran un patrón de latencia tipo II. En el LH los linfocitos no neoplásicos no expresan LMP-1 y todas las células neoplásicas que expresan EBERs expresan LMP-1, lo que sugiere que el papel oncogénico del VEB estaría mediado por LMP-1, que es una proteína con conocida actividad oncogénica. Se ha descrito que los casos de LH asociados a una cepa del VEB caracterizada por presentar una delección en el extremo carboxilo-terminal del oncogén LMP-1 son morfológicamente más agresivos <sup>(67, 101)</sup>.

### Linfomas T Periféricos y de células T/NK

Los linfomas T/NK nasales se asocian estrechamente con el VEB. El hecho de que en este tipo de neoplasias se detecte infección clonal y se observe expresión de LMP-1 en algunas células neoplásicas sugiere que el VEB pueda tener un papel patogénico. El 40% de los linfomas T-periféricos contiene algunas células infectadas por el VEB, que expresan EBERs y algunas también LMP-1. Característicamente en estos linfomas sólo una pequeña proporción de las células neoplásicas está infectada por el virus. Dentro de este grupo de trastornos linfoproliferativos, es el linfoma- T tipo angioinmunoblástico el que se asocia al VEB con mayor frecuencia (50%)<sup>(67, 80)</sup>.

### Linfomas B asociados a inmunodeficiencia

Tanto los procesos linfoproliferativos asociados al trasplante de órganos como los linfomas que aparecen en la infección por el VIH están estrechamente relacionados con el VEB. En estos procesos, la gran mayoría de las células neoplásicas muestran señal positiva para EBERs y además expresan todos los EBNAs y LMP-1 es decir, presentan un patrón de latencia de tipo III. La infección viral en la mayoría de los casos asociados al trasplante es de carácter policlonal mientras que en los asociados al SIDA suele ser de



carácter clonal. El hecho de que no en todos los linfomas asociados a inmunodeficiencia se detecte la presencia de VEB sugiere que este no es un factor necesario para el desarrollo de todas las neoplasias linfoides que se desarrollan en estos pacientes. Sin embargo parece que en los linfomas asociados al VEB que se desarrollan en este grupo de pacientes y que son la mayoría de los LNH de células grandes de los pacientes VIH seropositivos y todos los procesos linfoproliferativos asociados al trasplante de órganos, el VEB podría ser un único factor inductor del crecimiento, actuando en las primeras fases de la expansión celular. Posteriormente se producirían otras alteraciones moleculares que activarían oncogenes ó inactivarían genes supresores, las cuales serían responsables de la transformación maligna. Esto explicaría que se consiga la remisión de muchos trastornos linfoproliferativos post-trasplante asociados al VEB tras la retirada de la terapia inmunosupresora <sup>(102)</sup>.

## **6. Diagnóstico del CNF**

### **a) Signos clínicos**

#### **■ 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 <sup>(14, 16, 17, 19, 22, 45)</sup>.

### ■ 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;
- acufenos uni o bilaterales, o en menos casos como otalgia u otorrea.

### ■ 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.

### ■ 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 holo o hemicraneal relacionadas con una extensión endocraneal.

### ■ 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 <sup>(46)</sup>.

## b) Exploración física

### ■ 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 <sup>(14, 16, 45)</sup>. 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.

#### ■ **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.

#### ■ **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.

#### ■ **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.

#### ■ **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 <sup>(17, 19)</sup>. Suelen

ser voluminosas (>3 cm) en más del 60% de las ocasiones <sup>(19, 20, 45)</sup>. 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 <sup>(17, 18, 19)</sup>. El tamaño y la localización de las adenopatías son los elementos clave de la clasificación del grado N del sistema TNM.

#### ■ 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 <sup>(14, 15, 45)</sup>.

#### ■ 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, 45).

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 (47, 48).

### **c) Estudios complementarios**

#### **■ 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 (49). 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.

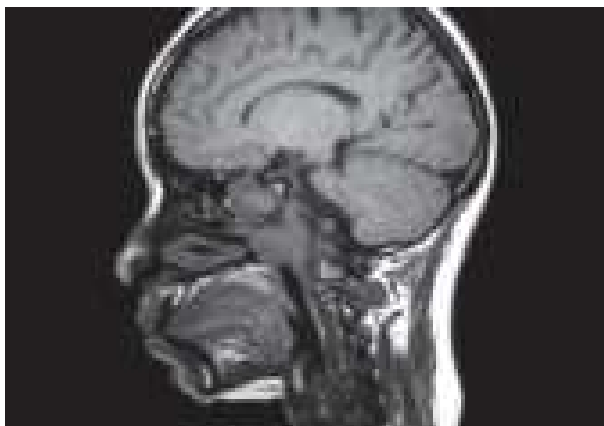
### **Resonancia magnética (RM) (Fig. 5, pág. 72)**

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 <sup>(49, 50)</sup>. 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 <sup>(50)</sup>.

**Figura 5.**

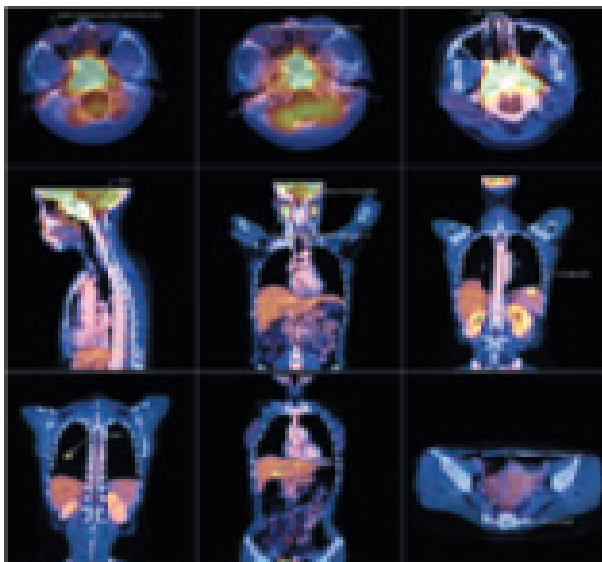
**A) Imagen de Resonancia Nuclear Magnética (RM) de un CNF.**



**B) Imagen de RM de un CNF.**



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





### ■ 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 <sup>(14, 15, 51)</sup>. 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% <sup>(52)</sup>.

### ■ 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 5**, pág. 60). El estudio chino de Mai y cols describe una sensibilidad de 0,84 del marcador viral en el plasma/suero <sup>(53)</sup>.

## ■ 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% <sup>(54)</sup>.

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 <sup>(55)</sup>. 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 posterapéutico <sup>(55)</sup>.

## 7. 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 7**, pág. 75). En la actualidad se dispone de los primeros análisis críticos de la versión de 1997 <sup>(56)</sup>, que han llevado a una versión más reciente, propuesta en 2002 <sup>(57)</sup>. 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 <sup>(56)</sup>.

**Tabla 7.** Clasificación TNM (tumor-ganglios-metástasis) de los Carcinomas de la nasofaringe. Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), 1997/2002 <sup>(56)</sup>

---

T1	Tumor limitado a la nasofaringe		
T2	Extensión a tejidos blandos de la orofaringe y/o de 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

---

## **8. 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 <sup>(14, 15, 22)</sup>. 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 <sup>(14, 17, 22)</sup>.

### **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 <sup>(14, 21)</sup>.

### **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 <sup>(14, 15, 21)</sup>. 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.

#### **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 <sup>(14, 15, 21)</sup>. El pronóstico parece ser mejor en los pacientes que tengan metástasis óseas aisladas, con supervivencias prolongadas superiores a los 5 años <sup>(14, 15)</sup>. Las metástasis aún siguen siendo un escollo terapéutico, a pesar de la mejoría del control locorregional que aporta la quimio-radioterapia.

### **9. 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 <sup>(58)</sup>. 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 leucocítico común) o de tipo B o T <sup>(58)</sup>.

#### **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 <sup>(59)</sup>. En los niños, la nasofaringe representa, en el caso de los tumores de tipo rhabdomyosarcoma, la segunda localización después de la órbita <sup>(60)</sup>. Los datos microscópicos permiten diferenciarlos, en los casos difíciles las tinciones de inmunohistoquímica para marcadores miogénicos como mioglobina, actina músculo-específica o desmina permiten 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 amelanótico del melanoma puede plantear un problema diagnóstico <sup>(61)</sup>. En estos casos, la inmunotinción fuertemente positiva para HMB45, Melan A y S100, 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 diferenciadas. 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 de colon y recto.





## **II. PLANTEAMIENTO DEL TEMA**

---



El Carcinoma Nasofaríngeo (CNF) es una neoplasia que tiene una alta incidencia en China y algunas áreas del sudeste asiático, con una asociación frecuente a la infección por el VEB, pero poco se conoce sobre su patogénesis en países occidentales, donde la incidencia de este tumor es baja y la infección por el VEB no es endémica.

Debido a la escasa sintomatología en etapas iniciales de la enfermedad, el diagnóstico no suele ser siempre temprano y la mortalidad es superior a la esperada, de hasta el 50% a los 5 años.

Existen pocos estudios sobre la epidemiología, comportamiento biológico y factores pronósticos del CNF fuera de Asia. Así por ejemplo, Gabusi y cols. han estudiado 26 casos de CNF en pacientes italianos, observando asociación VEB-CNF en el 65% de los casos.

Si bien el conocimiento de esta asociación es limitado en países occidentales, se ha demostrado que el VEB es un promotor importante en el mecanismo de carcinogénesis.

En este trabajo se pretende determinar la presencia del VEB en tejido tumoral de casos procedentes de hospitales latinoamericanos y europeos, o sea, de dos poblaciones distintas y no provenientes de zonas de alta incidencia del tumor. Se encuentra también entre los objetivos valorar algunos datos (edad, sexo y comienzo de la enfermedad clínica) que permitan establecer diferencias o similitudes con la forma de presentación habitual de la enfermedad que señalan las grandes series.



### **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



## **A. MATERIAL**

Para realizar este trabajo se han estudiado un total de 50 muestras de Carcinoma Nasofaríngeo provenientes de biopsias endoscópicas o de piezas de extirpación de ganglios linfáticos cervicales. Estas muestras proceden de diferentes orígenes:

- Departamento de Anatomía Patológica Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla España (**Origen A**) (24 casos);
- Servicio de Anatomía Patológica Hospital Sor María Ludovica La Plata, Buenos Aires, Argentina (**Origen B**) (6 casos);
- Consultoría en Patología, San Pablo, Brasil (**Origen C**) (20 casos).

Es necesario aclarar que 31 muestras biopsicas corresponden a pacientes a los cuales se les extirpó además un ganglio linfático metastásico. Todos los casos fueron examinados mediante las técnicas histológicas convencionales para establecer el diagnóstico según la clasificación de la OMS <sup>(14, 15, 16)</sup>. Para obtener la mayor objetividad posible los diagnósticos se establecieron a doble ciego obteniendo la concordancia del 100%.

Con el fin de cumplir con el planteamiento del tema se agrupan los casos según procedencia hospitalaria, con el objeto de poder establecer las comparaciones oportunas entre los datos clínicos obtenidos y los datos resultantes del estudio morfológico e inmunohistoquímico. Otras agrupaciones distintas son por sexo y grupos etáreos, situando en este último la línea de corte en 40 años.

Todos estos datos aparecen recogidos en la **Tabla 8** (pág. 88) en la cual se incluyen además algunos otros datos clínicos de interés para la consecución de los objetivos establecidos en el planteamiento del tema.

**Tabla 8.** Datos de las muestras utilizadas y de los pacientes.

ORDEN	SEXO	EDAD	DIAGNOSTICO (OMS)	MATERIAL EXAMINADO	METASTASIS	ORIGEN
1	H	25	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	A
2	M	48	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	A
3	H	75	Tipo 2	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	A
4	H	70	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
5	H	55	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	A
6	H	55	Tipo 1	Mucosa de cavum	NO	A
7	M	56	Tipo 1	Mucosa de cavum	NO	A
8	M	66	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	A
9	H	53	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
10	H	47	Tipo 2	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	A
11	H	71	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
12	H	57	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
13	H	56	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglios cervicales	SI	A
14	H	71	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglios cervicales	SI	A
15	H	45	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
16	H	75	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
17	M	44	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
18	H	85	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
19	H	46	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
20	H	52	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
21	M	85	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	A
22	H	44	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
23	H	35	Tipo 2	Mucosa de cavum	NO	A
24	H	53	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	A
25	H	12	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	B
26	M	18	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	B
27	H	18	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	B
28	H	12	Tipo 3	Mucosa de cavum	SI	B
29	M	8	Tipo 1	Mucosa de cavum	NO	B
30	H	33	Tipo 3	Mucosa de cavum	NO	B
31	H	24	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
32	M	43	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
33	M	16	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
34	H	15	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
35	H	31	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
36	H	48	Tipo 2	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
37	H	42	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
38	H	14	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
39	M	18	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
40	M	41	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
41	H	77	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
42	M	54	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
43	H	49	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
44	M	50	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
45	M	35	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
46	H	39	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
47	M	26	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
48	H	47	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
49	H	51	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C
50	H	17	Tipo 3	Mucosa de cavum-Ganglio cervical	SI	C



## B. MÉTODOS

### 1. Estudio histológico convencional

Todos los casos fueron examinados mediante estudio histológico convencional (inclusión en parafina y tinción de H-E) y valorados por dos patólogos.

Con el objeto de identificar la presencia del EBV, de conocer la actividad proliferativa de la lesión tumoral y de valorar comparativamente los resultados obtenidos, se recurre a las técnicas de Hibridación *in situ* y a la inmunohistoquímica.

### 2. Hibridación *in situ*

Se establece como método inicial para identificar la presencia del virus de Epstein Barr en cortes histológicos con la sonda EBER-PNA.

#### a. Reactivos y soluciones:

TBS (0.05 mol/l Tris/HCl, 0,15 mol/l NaCl), pH 7.5

50 ml 1M Tris pH 7,5

30 ml 5M NaCl

920 ml H<sub>2</sub>O destilada

Tritón

Proteinasa K DAKO (ref. S2019) 40X. Diluír 40 veces para obtener una concentración final de 9 µg/ml

Diluyente Prot. K DAKO (ref. S2032)

Sonda EBER/PNA DAKO (ref. M 0878)

Sistema de visualización LSAB, en visión u otros similares.

b. Protocolo de la Hibridación *in situ*:

- Realizar cortes histológicos de 3-4  $\mu\text{m}$  sobre portaobjetos xilanizados.
- Desparafinar e hidratar con gradiente decreciente de etanol.
- Incubar en Xilol durante 10 minutos.
- Lavar en 100% Etanol 5 min.
- Pasar a  $\text{H}_2\text{O}$  destilada.
- Digestión enzimática:

Colocar las preparaciones en cámara húmeda, añadir la proteína K diluida. (Para cada corte se preparan 100 $\mu\text{l}$ : 2,5  $\mu\text{l}$  Prot K + 97,5  $\mu\text{l}$  de diluyente) y colocar un cubreobjetos.

Incubar en estufa a 37° C durante 10 min (se puede hacer en baño).

- Lavado de muestras:

Lavar en agua destilada quitando el cubreobjetos con cuidado de no rozar la preparación (siempre con guantes) durante 10 segundos.

Sumergir las preparaciones en alcohol 96° durante 10 segundos.

Dejar secar la preparación.

- Incubar con la sonda:

Añadir una o dos gotas de sonda EBER/PNA-FITC DAKO a cada muestra y poner un cubreobjetos.

Incubar en estufa (en cámara húmeda) o en hibridador a 55° C durante 1 hora y 30 minutos.

- Lavado de astringencia:

Precalentar la solución de astringencia (0,1 % Tritón en TBS) en baño a 55° C.

Retirar las preparaciones e introducir estas en la solución astringente precalentada, a 55° C, durante 25 minutos.

Lavar los cristales con TBS (10 segundos) y dejarlos en agua destilada hasta comenzar el proceso de inmunohistoquímica.

- Detección con protocolo Chemmate LSAB:

Incubar con el anti-FITC DAKO, dilución 1:100.

Método de visualización LSAB DAKO, con Peroxidasa y DAB.

### **3. Estudio Inmunohistoquímico**

Como método complementario y no por ello de menor valor se recurre también, en segundo lugar, a la técnica inmunohistoquímica para la detección de LMP1, la cual se supone mas ventajosa por ofrecer mejor capacidad identificativa que las aplicables a la LMP2 y a la LMP3.

a. Reactivos y soluciones:

Anticuerpo purificado diluido (Dako) en tampón fosfato (PBS), ph 7,4 y seroalbumina bovina al 1% (BSA) con azida de sodio al 0,1% como conservante.

b. Protocolo de Inmunohistoquímica:

→ Preparación de la muestra:

- Utilizar tejido fijado en formol tamponado al 10%.
- Realizar cortes de 3 µm en portaobjetos xilanizados.
- Secar durante dos horas en estufa a 60°C.

→ Pretratamiento

- Desparafinar e hidratar con gradiente decreciente de etanol.
- Agua oxigenada al 2% en metanol para eliminar peroxidasa endógena
- Alcohol 96%

- Agua destilada
- PBS
- Desenmascarar antígenos mediante digestión enzimática en tripsina colocando los cristales en la placa caliente unos 20-30 minutos.
- Lavar con PBS

➔ Técnica:

- PBS
- Anticuerpo primario, 30 min.
- Lavado en PBS
- Anticuerpo biotinado
- Lavado en PBS
- Estreptavidina
- Lavado en PBS
- Cromógeno, 10 min.
- Lavado en PBS y luego en agua destilada
- Hematoxilina acuosa, 3 min.
- Pasar por agua caliente y montar en medio acuoso.

Con estos marcadores de incorporación viral a las células tumorales proliferantes o acompañantes, se apunta la intencionalidad de contribuir a dilucidar la participación de LMP1 en la patogénesis del CNF.

La totalidad de las muestras se han examinado y valorado mediante estudio histológico convencional (inclusión en parafina y tinción de H-E). No obstante, además se ha confirmado el diagnóstico a través de la aplicación de las técnicas inmunohistoquímicas para la identificación de citoqueratinas y linfocitos B o T (CD20 y CD3) siguiendo el protocolo de inmunotinción habitual. Todo este procedimiento facilita un diagnóstico convencional sustentado sobre una metodología más sofisticada, lo cual permite en cierto modo la estimación adicional del grado de diferenciación. Sin embargo, para una mayor aproximación al conocimiento de la capacidad proliferativa del tumor se ha

procedido al estudio inmunohistoquímico del índice de proliferación mediante el anticuerpo Ki67.

Todos los resultados obtenidos aplicando las técnicas anteriormente descritas se han valorado por dos patólogos a, doble ciego, mediante la aproximación objetiva del método de cruces (de + a +++). Las desviaciones subjetivas se han tratado de objetivar posteriormente mediante consenso.

Para la correcta estimación de los datos obtenidos es necesario aplicar un análisis estadístico de aquellos resultados que lo soportan por cuantía y calidad de los mismos.

#### **4. Método Estadístico**

Los cálculos han sido realizados con el programa estadístico SPSS versión 17.0. Los métodos utilizados han sido los siguientes:

- 1) Estadística descriptiva, tablas de frecuencias.
  
- 2) La relación entre variables cualitativas o cuantitativas categorizadas en intervalos se realizó mediante el test de la Chi-cuadrado y en el caso de tablas 2x2 mediante el test exacto de Fisher.



## **IV. RESULTADOS**

---





### A. Procedencia y datos clínicos de los pacientes

La procedencia de los distintos casos es 24 muestras (48%) del hospital europeo (HE) y 26 (52%) de hospitales latinoamericanos (HLA) (**Tabla 9**).

**Tabla 9. PROCEDENCIA**

	Nº de Casos	Porcentajes
HE	24	48%
HLA	26	52%
<b>Total</b>	50	100%

A efectos de la edad de los pacientes se agrupan en mayores y menores de 40 años, advirtiéndose que existen 32 mayores de 40 años (64%) y 18 menores de 40 años (36%) (**Tabla 10**).

**Tabla 10. EDAD: Valores absolutos**

	Nº de Pacientes			Porcentajes
	HE	HLA	TOTAL	TOTAL
1 > 40 años	22	10	32	64%
2 < 40 años	2	16	18	36%
<b>Total</b>	24	26	50	100%

En los pacientes del HE existe una mayor incidencia en mayores de 40 años (91,6%), en tanto que en los procedentes de HLA predominan en menores de 40 años (61,5%) (**Tabla 11**, pág. 98).

**Tabla 11. EDAD: Porcentaje por hospitales**

	Porcentajes	
	HE	HLA
1 > 40 años	91,6%	38,5%
2 < 40 años	8,4%	61,5%
<b>Total</b>	100%	100%

Con respecto al sexo 35 casos corresponden a varones (70%) y 15 a mujeres (30%) (Tabla 12).

**Tabla 12. SEXO: Valores absolutos**

	Nº de Pacientes			Porcentajes
	HE	HLA	TOTAL	TOTAL
Varones	19	16	35	70%
Mujeres	5	10	15	30%
<b>Total</b>	24	26	50	100%

Discriminados según procedencia el predominio en varones es del 79,1% (HE) y 61,5 % (HLA) respectivamente (Tabla 13).

**Tabla 13. SEXO: Porcentaje por hospitales**

	Porcentajes	
	HE	HLA
Varones	79,1%	61,5%
Mujeres	20,9%	38,5%
<b>Total</b>	100%	100%

En 31 casos (62%) existía metástasis en ganglios linfáticos cervicales y en 19 (38%) la enfermedad estaba localizada (**Tabla 14**).

**Tabla 14. TIPO DE ENFERMEDAD: Valores absolutos**

	Frecuencia			Porcentajes
	HE	HLA	TOTAL	TOTAL
Localizada	15	4	19	38%
Metastásica	9	22	31	62%
<b>Total</b>	24	26	50	100%

En la **Tabla 15** se recogen los porcentajes según procedencia de los casos de enfermedad localizada y metastásica, observándose un predominio de enfermedad a distancia en los provenientes de HLA (84,6%).

**Tabla 15. TIPO DE ENFERMEDAD: Porcentaje por hospitales**

	Porcentajes	
	HE	HLA
Localizada	62,5%	15,4%
Metastásica	37,5%	84,6%
<b>Total</b>	100%	100%

Todos estos resultados aparecen reflejados además en la **Tabla 16** (pág. 100). Para el análisis estadístico se aplican los dígitos 1 y 2, respectivamente a mayor y menor de 40 años, 1 y 2 respectivamente a hospital europeo y hospital latinoamericano, y 1 y 2 a la existencia o no de metástasis.

**Tabla 16.** Datos del historial clínico de los pacientes

ORDEN	SEXO	EDAD	TIPO HISTOLOGICO (OMS)	PROCEDENCIA*	METASTASIS
1	H	<40 años	Tipo 3	1	SI
2	M	>40 años	Tipo 3	1	SI
3	H	>40 años	Tipo 2	1	SI
4	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
5	H	>40 años	Tipo 3	1	SI
6	H	>40 años	Tipo 1	1	NO
7	M	>40 años	Tipo 1	1	NO
8	M	>40 años	Tipo 3	1	SI
9	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
10	H	>40 años	Tipo 2	1	SI
11	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
12	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
13	H	>40 años	Tipo 3	1	SI
14	H	>40 años	Tipo 3	1	SI
15	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
16	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
17	M	>40 años	Tipo 3	1	NO
18	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
19	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
20	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
21	M	>40 años	Tipo 3	1	SI
22	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
23	H	<40 años	Tipo 2	1	NO
24	H	>40 años	Tipo 3	1	NO
25	H	<40 años	Tipo 3	2	NO
26	M	<40 años	Tipo 3	2	SI
27	H	<40 años	Tipo 3	2	NO
28	H	<40 años	Tipo 3	2	SI
29	M	<40 años	Tipo 1	2	NO
30	H	<40 años	Tipo 3	2	NO
31	H	<40 años	Tipo 3	2	SI
32	M	>40 años	Tipo 3	2	SI
33	M	<40 años	Tipo 3	2	SI
34	H	<40 años	Tipo 3	2	SI
35	H	<40 años	Tipo 3	2	SI
36	H	>40 años	Tipo 2	2	SI
37	H	>40 años	Tipo 3	2	SI
38	H	<40 años	Tipo 3	2	SI
39	M	<40 años	Tipo 3	2	SI
40	M	>40 años	Tipo 3	2	SI
41	H	>40 años	Tipo 3	2	SI
42	M	>40 años	Tipo 3	2	SI
43	H	>40 años	Tipo 3	2	SI
44	M	>40 años	Tipo 3	2	SI
45	M	<40 años	Tipo 3	2	SI
46	H	<40 años	Tipo 3	2	SI
47	M	<40 años	Tipo 3	2	SI
48	H	>40 años	Tipo 3	2	SI
49	H	>40 años	Tipo 3	2	SI
50	H	<40 años	Tipo 3	2	SI

\* Procedencia Origen 1: Hospital Europeo  
Origen 2: Hospital Latinoamericano

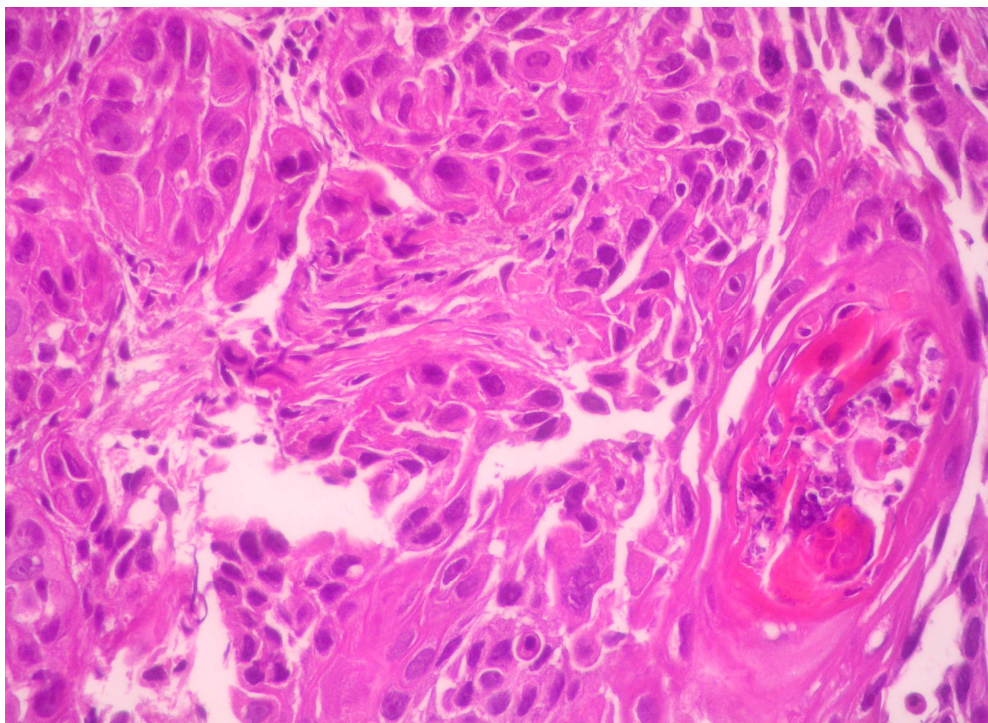
Tipo 1: Ca. Bien Diferenciado  
Tipo 2: Ca. No Epidermoide  
Tipo 3: Ca. Indiferenciado (Linfoepitelioma)

## B. Características histológicas

El diagnóstico histológico, la valoración de la atipia tisular (+/+++) y el recuento del número de mitosis ( $>$  o  $<$  10/10CGA -campos de gran aumento- 40x) aparecen reflejados en la **Tabla 17** (pág. 102).

Se advierte que al tipo 1 corresponden 3 casos (6%), al tipo 2, 4 casos (8%), y al tipo 3, 43 casos (86%). (**Tabla 18**, pág. 104) (**Fig. 6**, abajo, y **Figs. 7 y 8**, pág. 103).

**Fig.6:** CNF TIPO 1 OMS: Proliferación de células dispuestas en lóbulos, con citoplasmas amplios, eosinófilos con focos de queratinización.



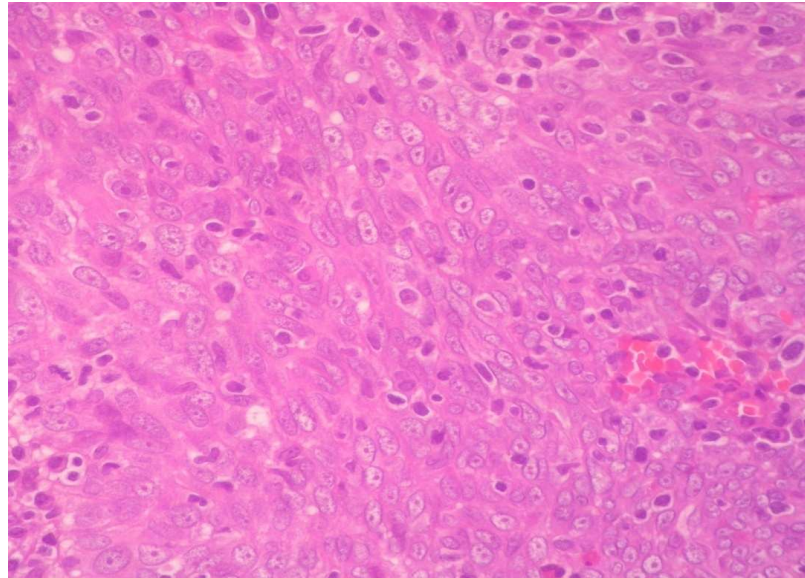
**Tabla 17.** Análisis histológico convencional de los casos.

ORDEN	DIAGNOSTICO	MITOSIS*	ATIPIA**
1	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
2	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
3	Tipo 2	>10/10CGA	***/**
4	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
5	Tipo 3	>10/10CGA	**/**
6	Tipo 1	>10/10CGA	***/**
7	Tipo 1	>10/10CGA	***/**
8	Tipo 3	>10/10CGA	**/**
9	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
10	Tipo 2	>10/10CGA	***/**
11	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
12	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
13	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
14	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
15	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
16	Tipo 3	<10/10CGA	*/**
17	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
18	Tipo 3	<10/10CGA	***/**
19	Tipo 3	<10/10CGA	***/**
20	Tipo 3	<10/10CGA	*/**
21	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
22	Tipo 3	<10/10CGA	***/**
23	Tipo 2	>10/10CGA	***/**
24	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
25	Tipo 3	>10/10CGA	*/**
26	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
27	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
28	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
29	Tipo 1	>10/10CGA	***/**
30	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
31	Tipo 3	>10/10CGA	**/**
32	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
33	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
34	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
35	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
36	Tipo 2	>10/10CGA	***/**
37	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
38	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
39	Tipo 3	>10/10CGA	**/**
40	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
41	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
42	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
43	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
44	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
45	Tipo 3	>10/10CGA	**/**
46	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
47	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
48	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
49	Tipo 3	>10/10CGA	***/**
50	Tipo 3	>10/10CGA	***/**

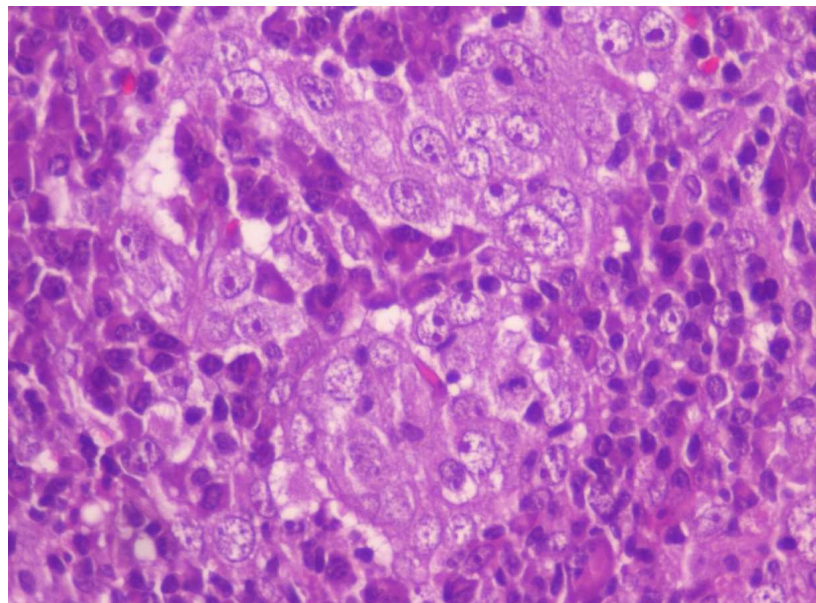
\* FIGURAS DE MITOSIS POR 10 CGA 40X

\*\* ATIPIA PLEOMORFISMO NUCLEAR EN CELULAS EPITELIALES

**Fig.7:** CNF TIPO 2 OMS: Proliferación de células poligonales con citoplasmas amplios.



**Fig.8:** CNF TIPO 3 OMS: Proliferación de células dispuestas en nidos con patrón sincitial, núcleos pleomórficos y nucleolos prominentes, rodeadas por estroma linfoide.



**Tabla 18. TIPO HISTOLÓGICO**

	Nº de Casos			Porcentajes		
	HE	HLA	TOTAL	HE	HLA	TOTAL
1	2	1	3	8,3%	3,8%	6%
2	3	1	4	12,5%	3,8%	8%
3	19	24	43	79,2%	92,4%	86%
<b>Total</b>	24	26	50	100%	100%	100%

El número de mitosis (**Fig. 9** abajo) por 10 CGA es mayor de 10 en 45 casos (90%) y menor de 10 en 5 casos (10%) (**Tabla 19**, pág. 105).

**Fig.9:** Imagen histológica con mitosis.

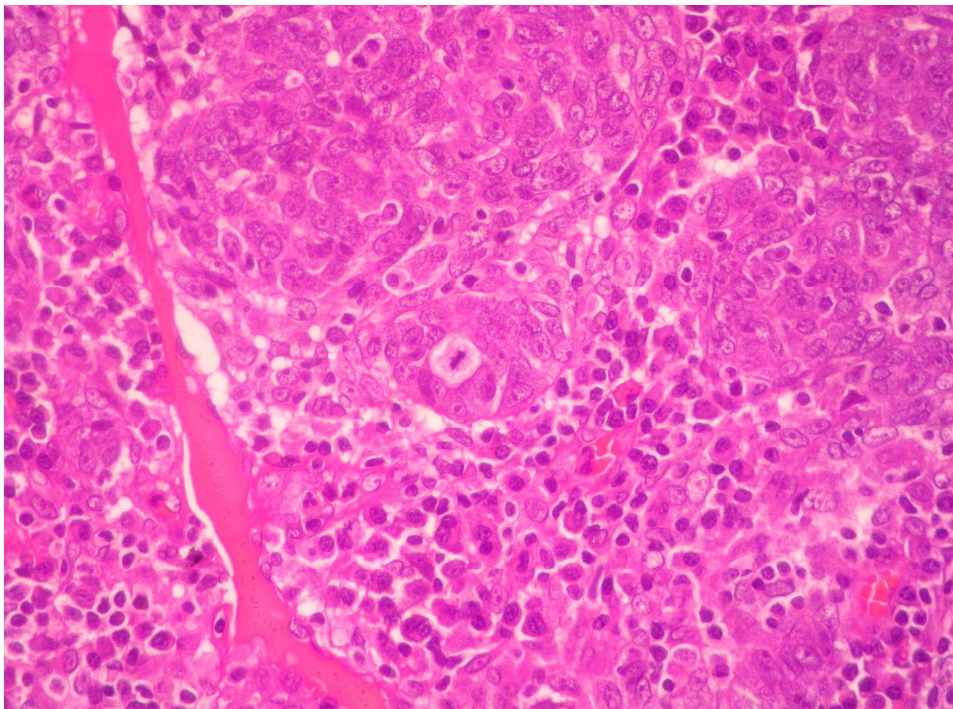


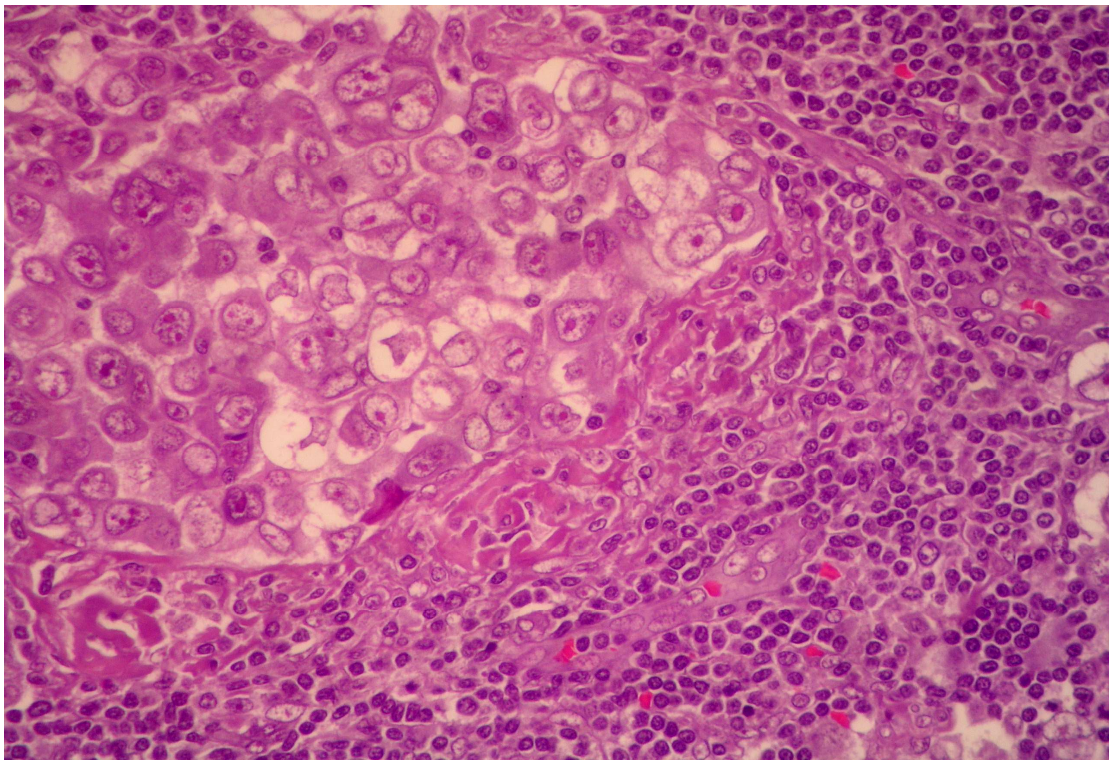


Tabla 19. NÚMERO DE MITOSIS/10CGA

	N° de casos			Porcentajes		
	HE	HLA	TOTAL	HE	HLA	TOTAL
> 10/10CGA	19	26	45	79,2%	100%	90%
< 10/10CGA	5	0	5	20,8%	0%	10%
<b>Total</b>	24	26	50	100%	100%	100%

Por otro lado la atipia celular es leve en 3 casos (6%), moderada en 5 casos (10%) y severa en 42 casos (84%) (Tabla 20, pág. 106) (Fig. 10).

Fig.10: Pleomorfismo nuclear (anisocariosis).



**Tabla 20. ATIPIA CITOLÓGICA**

	N° de casos			Porcentajes		
	HE	HLA	TOTAL	HE	HLA	TOTAL
Leve	2	1	3	8,3%	3,8%	6%
Moderada	2	3	5	8,3%	11,5%	10%
Severa	20	22	42	83,4%	84,6%	84%
<b>Total</b>	24	26	50	100%	100%	100%

Para el análisis estadístico posterior se aplican los dígitos 1 y 2 al recuento de mitosis (1= < 10/10CGA y 2 = > 10/10CGA), a la valoración de la atipia (1= leve o moderada, y 2 = severa); para la valoración del tipo histológico es preciso recurrir a 3 dígitos para ajustar el diagnóstico a los tres tipos establecidos por la OMS.

### **C. Identificación del VEB y su producto**

#### 1. Por hibridación *in situ*

En la **Tabla 21** (pág. 107) se recogen los resultados que ofrece la técnica haciendo una valoración distinta en el epitelio y en los linfocitos.

En el epitelio sólo se admiten 2 posibilidades, positivo o negativo con tinción nuclear (**Fig. 11**, pág. 109), siendo 36 casos (72%) positivos para EBER (**Tabla 22**, pág. 108).

Tabla 21. Identificación del EVB y su producto.

ORDEN	HIBRIDACION IN SITU EBV**		INMUNOHISTOQUIMICA LMP1*	
	EPITELIO	LINFOCITOS	EPITELIO	LINFOCITOS
1	Positiva	<5%	Positiva	<5%
2	Positiva	>5%	Positiva	>5%
3	Negativa	<5%	Negativa	<5%
4	Positiva	<5%	Positiva	<5%
5	Positiva	<5%	Positiva	<5%
6	Negativa	<5%	Negativa	<5%
7	Positiva	<5%	Positiva	<5%
8	Positiva	<5%	Positiva	<5%
9	Positiva	<5%	Negativa	<5%
10	Negativa	<5%	Negativa	<5%
11	Positiva	<5%	Positiva	<5%
12	Negativa	<5%	Negativa	<5%
13	Positiva	<5%	Positiva	<5%
14	Positiva	<5%	Positiva	<5%
15	Negativa	<5%	Negativa	<5%
16	Positiva	<5%	Positiva	<5%
17	Positiva	<5%	Positiva	<5%
18	Positiva	<5%	Positiva	<5%
19	Positiva	<5%	Positiva	<5%
20	Positiva	>5%	Positiva	>5%
21	Negativa	>5%	Negativa	>5%
22	Positiva	>5%	Positiva	>5%
23	Positiva	>5%	Positiva	>5%
24	Positiva	<5%	Positiva	<5%
25	Positiva	<5%	Positiva	<5%
26	Positiva	<5%	Positiva	<5%
27	Positiva	<5%	Positiva	<5%
28	Negativa	>5%	Negativa	>5%
29	Positiva	>5%	Positiva	>5%
30	Positiva	>5%	Positiva	>5%
31	Positiva	>5%	Positiva	>5%
32	Negativa	>5%	Negativa	>5%
33	Positiva	>5%	Positiva	>5%
34	Positiva	>5%	Positiva	>5%
35	Positiva	>5%	Negativa	>5%
36	Positiva	>5%	Positiva	>5%
37	Positiva	>5%	Positiva	>5%
38	Negativa	>5%	Negativa	>5%
39	Positiva	>5%	Positiva	>5%
40	Positiva	>5%	Positiva	>5%
41	Negativa	>5%	Negativa	>5%
42	Negativa	>5%	Negativa	>5%
43	Negativa	>5%	Negativa	>5%
44	Positiva	>5%	Negativa	>5%
45	Positiva	>5%	Positiva	>5%
46	Negativa	>5%	Negativa	>5%
47	Positiva	>5%	Positiva	>5%
48	Negativa	>5%	Negativa	>5%
49	Positiva	>5%	Positiva	>5%
50	Positiva	>5%	Negativa	>5%

\*\*ISH EBER Núcleos positivos

\*LMP1 Células positivas

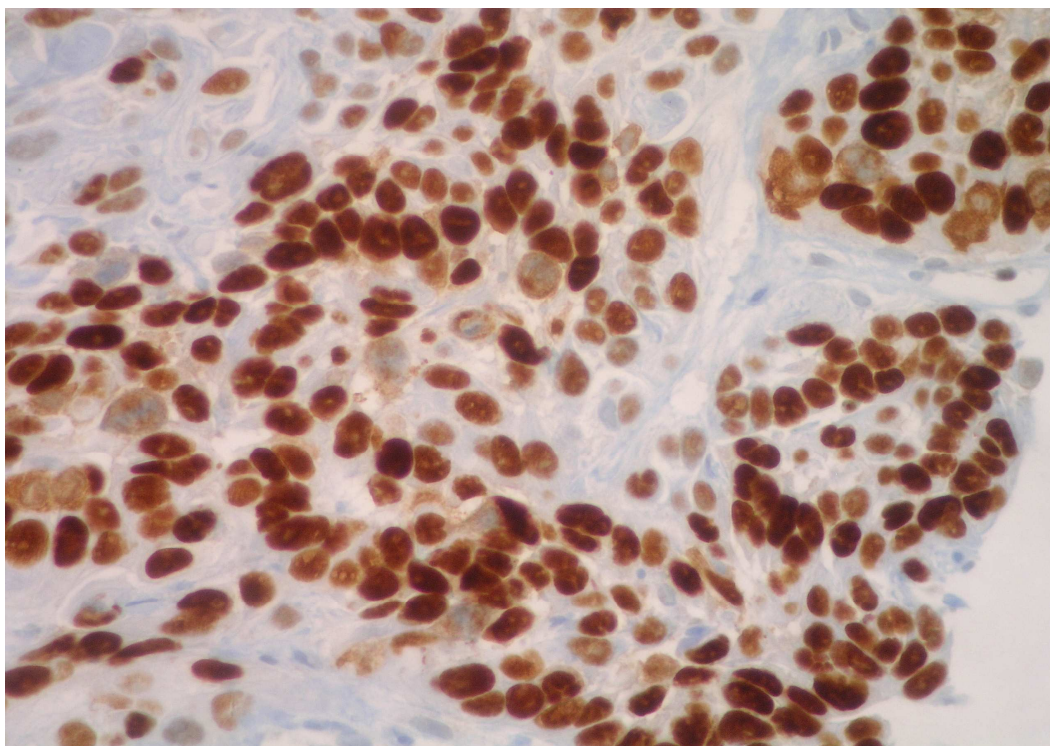
En la **Tabla 22** se recogen los resultados de la técnica de ISH EBER en células neoplásicas, discriminados según la procedencia de los casos. Así, se ha observado positividad con tinción nuclear (**Fig. 11**, pág. 109) en 18 casos (75%) provenientes del origen 1 (Hospital Europeo), en tanto que 6 (25%) resultaron negativos. De la misma manera, 18 casos (69,2%) provenientes del origen 2 (Hospital Latinoamericano) fueron positivos, en tanto que 8 (30,8%) fueron negativos. En cifras totales, 36 casos (72%) fueron positivos y 14 (28%) resultaron negativos.

**Tabla 22. EBV EN CÉLULAS EPITELIALES**

			ISH EBER en células neoplásicas		Total
			Positivo	Negativo	
Procedencia	1	Recuento	18	6	24
		Porcentaje dentro de procedencia	75%	25%	100%
	2	Recuento	18	8	26
		Porcentaje dentro de procedencia	69,2%	30,8%	100%
<b>Total</b>	Recuento		36	14	50
	Porcentaje total		72%	28%	100%

1: Hospital Europeo (HE) 2: Hospitales Latinoamericanos (HLA)

**Fig.11:** Hibridación *in situ* (ISH) EVB: Positividad nuclear intensa.



En los linfocitos se establecen también dos categorías pero dependiendo del porcentaje de células positivas superior o inferior al 5%. En la **Tabla 24** (pág. 110) se recogen los resultados de la técnica de ISH EBER en linfocitos, discriminados según la procedencia de los casos. Así, se ha observado positividad con tinción nuclear en menos del 5% en 19 casos (79,2%) provenientes del origen 1 (Hospital Europeo), en tanto que 5 (20,8%) lo fueron en más del 5%. En cambio 23 casos (88,5%) provenientes del origen 2 (Hospital Latinoamericano) fueron positivos en más del 5% de la celularidad, en tanto que 3 (11,5%) lo fueron en menor porcentaje.

**Tabla 24. EBV EN LINFOCITOS**

			ISH EBER en Linfocitos		Total
			<5%	>5%	
Procedencia	1	Recuento	19	5	24
		Porcentaje dentro de procedencia	79,2%	20,8%	100%
	2	Recuento	3	23	26
		Porcentaje dentro de procedencia	11,5%	88,5%	100%
<b>Total</b>	Recuento		22	28	50
	Porcentaje total		44%	56%	100%

1: Hospital Europeo (HE) 2: Hospitales Latinoamericanos (HLA)

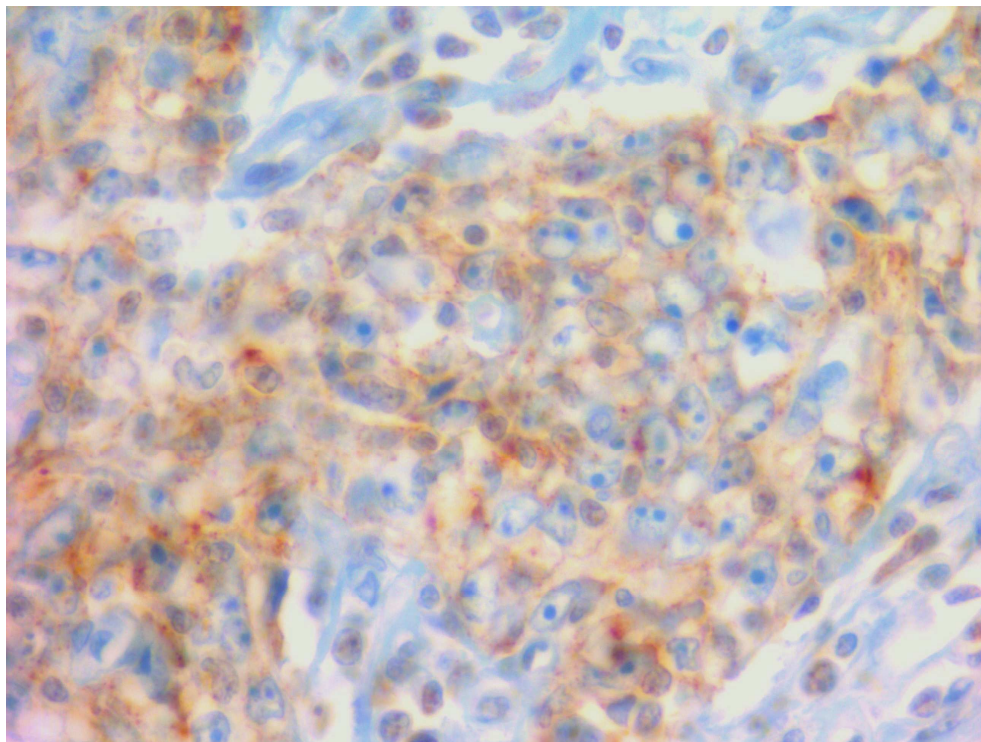
## 2. Por inmunohistoquímica

También en la **Tabla 25** se recogen los resultados de la inmunotinción para la proteína viral LMP1 (**Fig. 12** pág. 111), ajustándose la valoración a la misma sistemática aplicada anteriormente para la hibridación *in situ*, presentando 32 casos (64%) inmuno reacción positiva a este producto viral con tinción de membrana.

**Tabla 25. LMP 1 EN CELULAS EPITELIALES**

	Frecuencia			Porcentajes		
	HE	HLA	TOTAL	HE	HLA	TOTAL
Casos Positivos	17	15	32	70,9%	57,7%	64%
Casos Negativos	7	11	18	29,1%	42,3%	36%
<b>Total</b>	24	26	50	100%	100%	100%

**Fig.12:** Técnica Inmunohistoquímica para LMP1

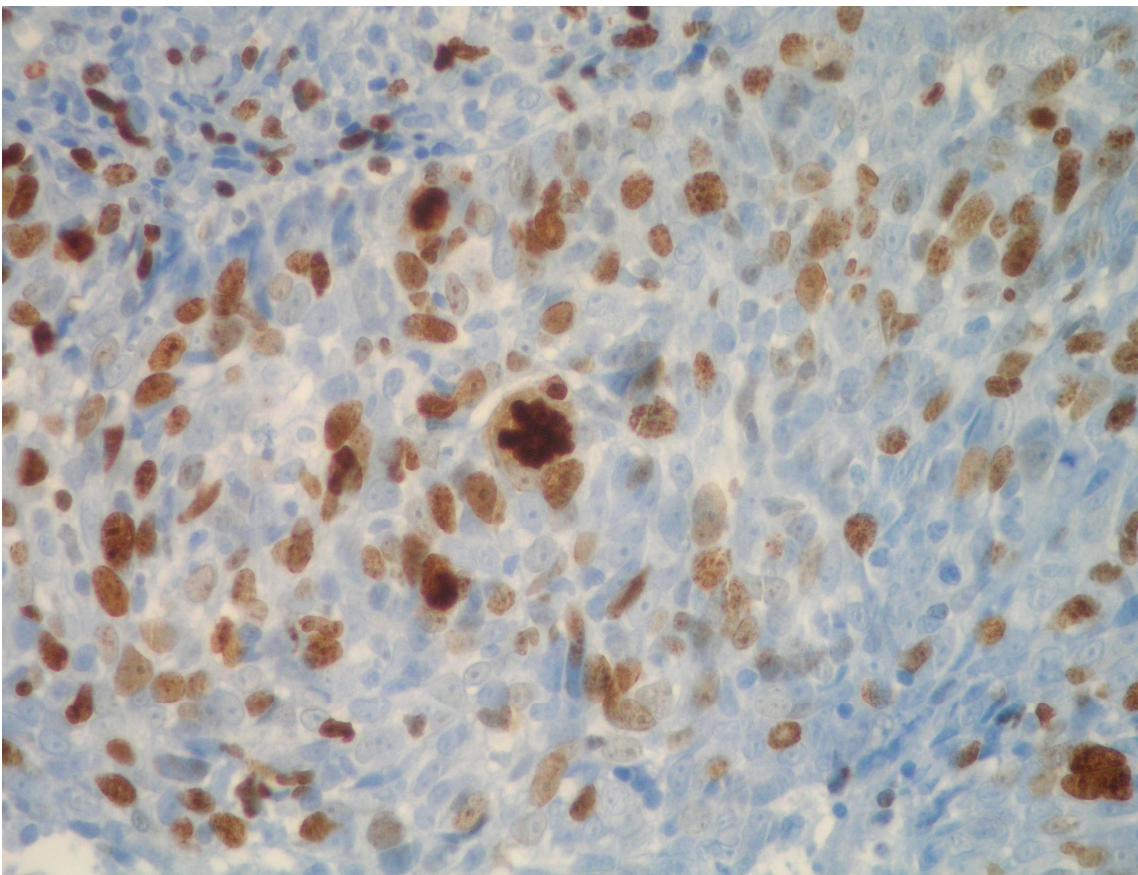


#### **D. Otros parámetros inmunohistoquímicos**

En la **Tabla 26** (pág. 113) se recogen los resultados del estudio inmunohistoquímico para diferenciar la población epitelial del estroma linfoide acompañante. Así, la inmunomarcación para citoqueratina ha sido positiva con tinción de membrana en el 100% de los casos, en tanto que se ha observado positividad para la proteína p53, con tinción nuclear en 5 casos (10%) (**Tablas 26**, pág. 113, y **27**, pág. 114).

El índice de proliferación Ki67 (con tinción nuclear) se ha valorado en dos categorías, 1 mayor al 5% de células positivas, 28 casos (56%) (**Fig. 13**, abajo) y 2 menor al 5%, 22 casos (44%), respectivamente (**Tablas 26**, pág. 113, y **28**, pág. 114).

**Fig.13:** Técnica Inmunohistoquímica para Ki67: Índice de proliferación > 5%.





**Tabla 26.** Resultados de distintos parámetros inmunohistoquímicos.

ORDEN	POBLACION EPITELIAL		
	CITOQUERATINA	Ki 67*	p53**
1	Positiva	<5%	Positiva
2	Positiva	>5%	Negativa
3	Positiva	<5%	Negativa
4	Positiva	<5%	Negativa
5	Positiva	<5%	Negativa
6	Positiva	<5%	Negativa
7	Positiva	<5%	Negativa
8	Positiva	<5%	Negativa
9	Positiva	<5%	Negativa
10	Positiva	<5%	Negativa
11	Positiva	<5%	Positiva
12	Positiva	<5%	Negativa
13	Positiva	<5%	Negativa
14	Positiva	<5%	Negativa
15	Positiva	<5%	Negativa
16	Positiva	<5%	Negativa
17	Positiva	<5%	Negativa
18	Positiva	<5%	Negativa
19	Positiva	<5%	Negativa
20	Positiva	>5%	Positiva
21	Positiva	>5%	Negativa
22	Positiva	>5%	Negativa
23	Positiva	>5%	Negativa
24	Positiva	<5%	Negativa
25	Positiva	<5%	Negativa
26	Positiva	<5%	Negativa
27	Positiva	<5%	Negativa
28	Positiva	>5%	Negativa
29	Positiva	>5%	Negativa
30	Positiva	>5%	Negativa
31	Positiva	>5%	Negativa
32	Positiva	>5%	Negativa
33	Positiva	>5%	Negativa
34	Positiva	>5%	Negativa
35	Positiva	>5%	Negativa
36	Positiva	>5%	Negativa
37	Positiva	>5%	Negativa
38	Positiva	>5%	Negativa
39	Positiva	>5%	Negativa
40	Positiva	>5%	Positiva
41	Positiva	>5%	Positiva
42	Positiva	>5%	Negativa
43	Positiva	>5%	Negativa
44	Positiva	>5%	Negativa
45	Positiva	>5%	Negativa
46	Positiva	>5%	Negativa
47	Positiva	>5%	Negativa
48	Positiva	>5%	Negativa
49	Positiva	>5%	Negativa
50	Positiva	>5%	Negativa

\* Ki67 Núcleos positivos por 10 CGA

\*\* p53 Núcleos positivos por 10 CGA

**Tabla 27. PROTEINA p53**

	Frecuencia			Porcentajes		
	HE	HLA	TOTAL	HE	HLA	TOTAL
Casos Positivos	3	2	5	12,5%	7,7%	10%
Casos Negativos	21	24	45	87,5%	92,3%	90%
<b>Total</b>	24	26	50	100%	100%	100%

**Tabla 28. INDICE DE PROLIFERACION Ki-67**

	Frecuencia			Porcentajes		
	HE	HLA	TOTAL	HE	HLA	TOTAL
> 5%	5	23	28	20,9%	88,5%	56%
< 5%	19	3	22	79,1%	11,5%	44%
<b>Total</b>	24	26	50	100%	100%	100%





## **V. DISCUSIÓN**

---



El Carcinoma Nasofaríngeo (CNF) representa el 2% de todas las neoplasias de cabeza y cuello en Europa y América del Norte, de forma que la incidencia anual en Estados Unidos es de menos de 1 caso/100.000 habitantes/año. Sin embargo, la frecuencia es mucho mayor en el sur de China, Taiwán, Sudeste Asiático, Norte de África, Groenlandia y Alaska, donde la incidencia es hasta de 30 a 50 casos/100.000 habitantes año <sup>(63)</sup>. Este curioso patrón de distribución geográfica, observado ya en 1930 por Digby <sup>(64)</sup>, motivó la clasificación de los distintos territorios en tres grupos:

- Zonas de alto riesgo; con una incidencia superior a 15 casos/100.000 hab/año (sur de China, Taiwán, Sudeste Asiático). En estas áreas el CNF abarca el 75% de todos los carcinomas otorrinolaringológicos.
- Zonas de riesgo intermedio; con una incidencia de 5-7 casos/100.000 hab/año. Incluye el Magreb (Marruecos, Túnez, Argelia) y otros países africanos como Kenia, Uganda, Tanzania y Sudán.
- Zonas de bajo riesgo; con valores en torno a un caso nuevo/100.000 hab./año. Abarca el resto del Mundo. En estas áreas el CNF representa entre el 1 y el 3% de los tumores otorrinolaringológicos.

Estas variaciones regionales sugieren la importancia de los factores genéticos, étnicos, y factores de desarrollo como hábitos alimentarios, entre los que destaca el consumo de pescados y carnes preservados en salazón <sup>(65)</sup> ricos en nitrosaminas: Nitrosodimetinamina (NDMA), N-nitrospirrolidina (NPYR) y N-nitrospiperidina (NPIP) <sup>(66)</sup>. Además de estos, otros factores pueden contribuir al desarrollo de esta neoplasia, como agentes contaminantes (ej. el níquel) que han sido apuntados por Wu et al <sup>(67)</sup>. En un estudio reciente sobre los factores ocupacionales como materiales de la construcción y la exposición a metales, residuos de madera, combustibles y gases de motores, pinturas y barnices, solo la

exposición a residuos de madera ha sido estadísticamente significativa <sup>(68)</sup>. En resumen, el CNF es una neoplasia cuya tumorigénesis es multifactorial con factores genéticos, dietarios y de comprobada exposición a otros agentes.

El presente trabajo, con 50 casos de pacientes de dos continentes, intenta aproximarse al estudio del conocimiento patogenético de esta neoplasia fuera de regiones como Asia Oriental donde se considera al VEB como el principal promotor para la génesis del tumor.

El CNF se origina en una población media mucho más joven que la que afecta el resto de las neoplasias de cabeza y cuello, con una incidencia, en zonas de alto riesgo, que crece a partir de los 20 años con un pico situado entre la 4ª y la 5ª décadas de la vida (frente a 50 a 70 años del resto de tumores cervicofaciales). Una característica distribución con dos picos situados en torno a los 20 y los 60 años aparece en algunas zonas de riesgo intermedio y bajo <sup>(69, 70)</sup>. De toda la literatura revisada, el caso más joven de CNF se detectó en un niño de dos años <sup>(71)</sup>; en el otro extremo encontramos un paciente de 91 años que presentó la neoplasia en esta edad avanzada <sup>(72)</sup>.

En la población caucásica, el pico de edad se encuentra entre los 55-65 años, mientras que en China se encuentra entre los 40-45 años. En la población del Norte de África existe una distribución bimodal de la edad: entre los 10 y 20 años y entre los 55-65 años <sup>(73)</sup>.

En la serie de 50 casos estudiados por nosotros advertimos una incidencia del 64 % en pacientes mayores de 40 años, lo cual es coincidente con los resultados de otras series procedentes de países en los que la incidencia general de este tumor no es elevada <sup>(74, 75, 76)</sup>.

No obstante si desglosamos según procedencia hospitalaria, europea o latinoamericana, advertimos que la incidencia en pacientes mayores de 40 años



es superior en la primera (91,6%) que en la segunda (38,5%). Este dato diferencial es difícil de interpretar, pero en un intento de búsqueda de similitudes genéticas o ambientales que puedan justificar este diferente modo de presentación, sólo cabe interpretar una posible participación de factores propios de países donde la afectación tumoral tiene un cierto carácter endémico. En este sentido los casos procedentes de hospitales latinoamericanos son mayoritariamente de Brasil, país con componente de población asiática superior a España, y en concreto a Sevilla, lugar de asiento del hospital europeo en cuestión.

El CNF resalta por su comportamiento maligno, con una extensa invasión locorregional, invasión linfática precoz y alta incidencia de diseminación hematógena. Tanto es así que en los tumores en estadio avanzado se produce invasión de base del cráneo y senos paranasales, diseminación intracraneal, infiltración de nervios craneales y extensión a estructuras mas distantes (fosa infratemporal, órbita e hipofaringe). La diseminación linfática sucede precozmente en el curso de la enfermedad debido al extenso plexo linfático que existe en la nasofaringe.

En el estadiaje que se lleva a cabo mediante RNM, aproximadamente un 20% de los pacientes no muestran adenopatías cervicales ostensibles, y casi la mitad tienen afectación linfática retrofaríngea <sup>(77)</sup>. El ganglio yugulodigástrico es el que con más frecuencia está comprometido en el momento de presentarse la enfermedad, y la afectación de la cadena cervical posterior es más común que en otros cánceres de cabeza y cuello.

La estrecha asociación entre el nivel topográfico de la extensión linfática y la incidencia de invasión a distancia, refleja que la diseminación hematógena se produce principalmente por la vía de drenaje de los vasos linfáticos en los grandes vasos sanguíneos en el extremo inferior de la vena yugular. Localizaciones más comunes de los depósitos hematógenos son, en orden descendente de frecuencia, pulmones, hígado y ganglios alejados <sup>(78)</sup>.

Con todos estos datos, en cada caso particular se aplica el sistema de estadiaje TNM <sup>(79, 80)</sup>, propio de esta localización, que facilita evaluar el comportamiento biológico del tumor y realizar las consideraciones terapéuticas oportunas.

Habida cuenta de la descripción anterior y tratando de hacer énfasis en los resultados obtenidos del estudio de nuestra serie podemos hacer varias consideraciones:

- a) A pesar del aspecto histológico agresivo que presenta el CNF (principalmente el tipo 3) y de la alta capacidad invasiva que se le atribuye en la literatura mundial <sup>(81, 82, 83)</sup>, la realidad es que la mayor parte de los casos se diagnostican en estadios iniciales de la enfermedad con simple afectación locorregional.
- b) La enfermedad se presenta localizada en el 38% de los casos y de forma metastásica en el 62% restante. Esto sugiere que se trata de un tumor con agresividad local bastante silente que permite un periodo clínico prolongado, el cual facilita la invasión de plexos linfáticos y la aparición de metástasis sin otros signos y síntomas clínicos suficientemente llamativos para que el diagnóstico se produzca de manera mas temprana.
- c) Entendiendo que nuestra serie de 50 casos está compuesta por dos orígenes hospitalarios distintos, parece oportuno hacer referencias a cada una de estas circunstancias. La incidencia de enfermedad metastásica en los casos de origen latinoamericano es muy superior (84,6%), siendo la incidencia en casos de origen europeo de 37,5%. Esta diferencia viene marcada por el sesgo que ha podido producir el hecho de que uno de los dos hospitales

latinoamericanos recoge principalmente casos diferidos de otros centros para practicar la consulta adecuada antes de enfocar el tratamiento oportuno.

La asociación entre VEB y CNF se ha confirmado identificando el genoma del virus en las células tumorales. El genoma del VEB se encuentra en células que forman parte de lesiones displásicas preinvasivas <sup>(84)</sup>. Este hallazgo indica que la infección por VEB es un evento inicial en la carcinogénesis en múltiples estadios del CNF. El genoma del VEB es una molécula de DNA de doble hélice que incluye más de 100 genes de los cuales sólo 10 se expresan en células con infección latente. Por un lado se han identificado seis proteínas nucleares (EBNAs), dos proteínas de membrana (LMPs) y dos moléculas de RNA no codificante (EBERs). Por otro lado se entiende que estas moléculas o algunas de ellas juegan algún papel efectivo en el crecimiento celular mediado por el VEB.

Las enfermedades asociadas con el VEB suelen presentar expresión génica limitada a uno de tres patrones de latencia. El CNF presenta el segundo tipo de latencia en el cual se expresan el EBNA 1, LMP1, LMP2 y EBERs. EBNA 1 se expresa en casi todos los casos de CNF positivos para EBV y es importante en la replicación del genoma viral durante la división celular. La proteína LMP1 actúa como una sustancia oncogénica: altera el crecimiento, sobrerregula diversas proteínas celulares que inhiben la apoptosis (bcl2 y A20) y se liga a numerosas proteínas asociadas con el receptor del TNF. También está involucrada en la activación de algunos factores de transcripción, moléculas de adhesión y citoquinas. La LMP1 se expresa en casi dos tercios de los CNF positivos para el VEB. La LMP2 también se expresa en el CNF y previene la reactivación del virus bloqueando la fosforilación por tirosinquinasa. Los EBERs no codifican proteínas pero pueden ser importantes para la oncogénesis y para la resistencia a la apoptosis <sup>(85, 86, 87, 88)</sup>. En la patogénesis del CNF se cree que hay un incremento de la expresión de LMP1 y p53 en las células epiteliales <sup>(89)</sup>.

En el presente trabajo hemos tratado de demostrar la participación del virus en el CNF mediante el estudio inmunohistoquímico de la expresión de LMP1 y el estudio por hibridación *in situ* de la latencia del VEB en tejidos tumorales. Tanto es así que la hibridación *in situ* del EBER ha sido descrita como una técnica de gran sensibilidad (98%) y alta especificidad (100%) en este mismo tipo tumoral<sup>(90)</sup>. No obstante, cifras más bajas también se han descrito en la literatura. La mayoría de los estudios han demostrado entre un 90 y un 100% de asociación entre VEB y CNF tipo 3 y un menor grado de asociación con las formas más diferenciadas (tipos 1 y 2)<sup>(73)</sup>.

En nuestro trabajo el 72% de los pacientes presentan EBER positivo, no obteniéndose datos significativos con respecto al estadio clínico y al tipo histológico, si bien la mayor incidencia de positividad corresponde al tipo 3 en consonancia con la presencia de metástasis en ganglios cervicales.

Este resultado es más o menos coincidente con los datos obtenidos por Gabusi y cols.<sup>(62)</sup> (65%) en una serie de 26 casos de CNF de origen italiano, pertenecientes en su mayor parte al tipo 3. En los casos positivos la señal es estrictamente nuclear y distribuida homogéneamente por todas las células tumorales, pudiéndose advertir en ocasiones junto al tumor primitivo la detección en células del epitelio nasofaríngeo peritumoral.

En otros estudios practicados en tumores de una población tunecina se demuestra también por hibridación *in situ* una positividad muy próxima al 100%<sup>(93)</sup> en casos de CNF tipo 3. Un examen global de todos estos resultados parece apuntar hacia una mayor participación del VEB en la génesis del CNF tipo 3 o indiferenciado, que a su vez es el principal protagonista en la población asiática donde se establece una cierta incidencia endémica y de la infección asociada.

La proteína LMP1 es una proteína integral transmembrana que funciona como un miembro de la familia de receptores del TNF. Si bien el mecanismo de

transformación es desconocido, la LMP1 potencia una variedad de señales intracelulares incluyendo el factor kappa  $\beta$ , una proteína quinasa activadora de factores mitógenos <sup>(94)</sup>. Con respecto a la determinación inmunohistoquímica de LMP1 nuestros resultados siguen la misma línea de trabajos previos procedentes de países no asiáticos, si bien los valores no son nítidamente coincidentes, pues advertimos la positividad en el 64% de los casos mientras otros autores sólo lo demuestran en torno al 10% de casos procedentes del área mediterránea <sup>(93)</sup>. Con respecto a nuestra observación habría que considerar que el porcentaje referido contempla globalmente todos los tipos histológicos. A pesar de tener una misma orientación o tendencia la aplicación del estudio inmunohistoquímico, la diferencia de valor en los distintos trabajos es muy llamativa, mas aún si se contemplan otros trabajos (Virginia, USA) extremadamente discordantes en los que la inmunomarcación para LMP1 resulta negativa en absolutamente todos los casos <sup>(95)</sup>.

Los resultados obtenidos en nuestra serie reflejan una relación entre los dos marcadores de infección vírica, LMP1 y EBER, lo cual guarda cierta semejanza con los referidos en otros trabajos <sup>(81, 96, 110)</sup>.

Anteriormente se ha expresado que la carcinogénesis nasofaríngea no está del todo aclarada y la participación del VEB tiene algunos matices especulativos. Tanto es así que alteraciones de la oncoproteína p53 también han sido implicadas en el proceso, pero no se ha podido establecer con precisión el papel que juega este factor favorecedor de la apoptosis cuyo defecto promueve la proliferación celular. Sobre este punto de la carcinogénesis se han aportado algunos datos discordantes señalando que el mecanismo de acumulación de p53 en el núcleo de células del CNF puede ser diferente del que se describe en otras formas de cáncer. En este sentido, en distintos trabajos <sup>(97, 98, 99, 100)</sup> se apunta que la proteína p53 se puede acumular en el núcleo sin que exista mutación o delección del gen. Esto no resulta del todo aceptable en tanto que nuestros resultados inmunohistoquímicos, incluso en ausencia de contraste de examen biomolecular,

parecen acercarse más a la realidad; sólo el 10% de los casos presentan inmunorreacción positiva nuclear para la p53. En consecuencia, no parece que esta vía carcinogénica tenga una seria repercusión en el desarrollo del CNF. La ausencia de mutación o delección del gen sugiere que la pérdida de la función, en algunos casos, puede estar comprometida a nivel proteico.

Con respecto a los tipos histológicos y las diferencias existentes con la vinculación al VEB, en nuestra serie, un caso de los tres estudiados correspondientes al tipo 1, ha resultado negativo con la técnica de ISH para EBER, en tanto que ninguno de los tres registraba metástasis ganglionar al momento del diagnóstico y en dos el índice de proliferación Ki 67 se encontraba por debajo del 5%. La proteína p53 fue negativa.

Dos de los cuatro casos correspondientes al tipo 2 fueron negativos con ISH para EBER, registrando tres pacientes enfermedad metastásica al momento del diagnóstico, si bien el índice de proliferación se encontraba por debajo del 5 % en dos casos.

De los 43 casos del tipo 3, hemos observado positividad para VEB en 32, en consonancia con metástasis en ganglios linfáticos cervicales en 29 de ellos y un índice de proliferación superior al 5 %.

El CNF se asocia con frecuencia con el VEB, lo cual ha sido reiteradamente expresado a lo largo del presente estudio. También se ha insistido en que el CNF tiene una incidencia más baja en los países occidentales que en el extremo oriente y que la latencia del VEB en el CNF es menos prevalente en aquellos países. Parece que el VEB es a su vez más prevalente en tumores tipo 3, lo cual no puede ser demostrado significativamente, desde el punto de vista estadístico, debido a que en esta serie de tumores procedentes de hospitales europeo y latinoamericanos la incidencia de los tipos 1 y 2 es muy baja.

## **VI. CONCLUSIONES**

---





1. La incidencia del CNF es mucho mayor en países del sureste asiático y del norte de África que en países europeos y latinoamericanos, siendo las series de casos publicadas en este medio muy cortas en comparación con las series de los países de mayor incidencia.
  
2. Es una neoplasia que tanto en el medio europeo como en el latinoamericano presenta baja incidencia. La edad media de incidencia es significativamente superior en la serie europea respecto a la serie latinoamericana, si bien no se encuentran diferencias entre series en la relación hombre/mujer.
  
3. La asociación entre el CNF y la infección por el EBV se ha establecido en los casos procedentes de los países de alta incidencia, lo cual conlleva un predominio del tipo histológico 3 o linfocarcinoma próximo al 100%. Esta asociación es menos acusada en pacientes procedentes de Latinoamérica y de España, de forma similar a lo que ocurre en otras poblaciones de origen caucásico, siendo una de sus posibles consecuencias la ligera menor incidencia del tipo histológico 3 o linfocarcinoma.
  
4. El número de mitosis por 10 CGA, la atipia y la diferenciación celular, carecen de variaciones significativas entre las dos series estudiadas. Pero

tanto estas como las grandes diferencias encontradas en el índice de proliferación Ki67 no permiten una fácil interpretación.

5. El diagnóstico histológico definitivo sucede de forma más temprana en los pacientes del hospital europeo que en los pacientes de hospitales latinoamericanos. En estos últimos, el diagnóstico de metástasis cervical es mucho más frecuente y por consiguiente el estadio más avanzado en el momento de iniciar el tratamiento.

6. La *hibridación in situ* del EBER es la prueba más fiel para demostrar la participación del VEB en la génesis tumoral. En países asiáticos de alta incidencia, la prueba es positiva en casi la totalidad de los casos, sin embargo, en países europeos la positividad es solo un valor próximo al 75%.

7. La *hibridación in situ* es una metodología biomolecular más sensible y específica para la demostración del VEB en tejido incluido en parafina que el método inmunohistoquímico para la detección de la proteína latente de membrana.

8. La demostración de positividad para EBER, mediante *hibridación in situ*, en la población linfocitaria del tumor, demuestra el paso del virus por células inmunocompetentes pero no permite confirmar hipótesis inmunogénicas.

**9.** No es aceptable la interpretación biomolecular de que en el CNF, igual que en otros tumores, la acumulación de p53 en el núcleo celular dificulte la apoptosis. Las opiniones contradictorias surgidas a este respecto carecen de mayor sentido pues la inmunoreacción nuclear es solo positiva de forma ocasional.

**10.** La detección inmunohistoquímica de la proteína latente de membrana se correlaciona con el porcentaje de células positivas para el VEB detectada por *hibridación in situ*, sin embargo es menos sensible.



## **VII. 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 A<sup>10</sup>. 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, Vandebrouck 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. X-ray 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 pharyngoesophageal 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. Boussen 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, Boussen 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. Gharbi MK, Gritli S. Boussen 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 RASSF1 A 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. Goldsmith DB, West TM, Morton R. HLA associations with nasopharyngeal carcinoma in Southern Chinese: a metaanalysis. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 2002; 27:61-7.
40. 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.
41. 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.
42. Bonfils P, Chevalier JM. In: *Anatomie ORL*. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 1998. p. 226-45.
43. 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.
44. Bourjat P, Kahn JL, Veillon F. Imagerie ORL. In: Doyon D, Monnier L, editors. *Cahiers de radiologie*. Paris: Masson; 1996. p. 69-85.
45. Marandas P, Marandas N. Cancers du nasopharynx. *Rey Prat* 2000; 50:1556-61.
46. Hsu WM, Wang AG. Nasopharyngeal carcinoma with orbital invasion. *Eye* 2004; 18:833-8.
47. 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.
48. Mebazaa A, Boussen H, Noura 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.
49. 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.

50. 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.
51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. 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.
55. 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.
56. Sobin LH, Wittekind CH. Pharynx. In: *TNM classification of malignant tumours UICC publication*. New York: Wiley-Liss; 2002. p. 27-35.
57. 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.
58. 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.
59. Cansiz H, Guvenc MG, Sekercioglu N. Surgical approaches to juvenile nasopharyngeal angiofibroma. *J Craniomaxillofac Surg* 2006; 34:3-8.
60. 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.
61. 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.

62. Gabusi E, Lattes C, Fiorentino M, D'Errico A, Grigioni WF. Expression of Epstein-Barr virus-encoded RNA and biological markers in Italian nasopharyngeal carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20:371-6.
63. Aparicio J, Llorca C, Montalar J. Carcinoma de nasofaringe. En: Gonzalez Barón M. ed. *Cáncer de cabeza y cuello* 1995; 207-222. 1º ed. Ediciones Ergón, S.A. Madrid.
64. Brugere J, Batani P, Chavanne G, Laurent M. Tumeurs malignes du nasopharynx (cavum). *Encycl. Med. Chir. París, Oto-rhino-laryngologie* 1983; 20590 A10, 11.
65. Yu MC. Diet and nasopharyngeal carcinoma. *FEMS Microbiol Immunol* 1990; 2: 235-42.
66. Poirier S, Ohshima H, de The G, Hubert A, Bourgade MC, Bartsch H. Volatile nitrosamine levels in common foods from Tunisia, south China and Greenland, high-risk areas for nasopharyngeal carcinoma (NPC). *Int J Cancer* 1987; 39: 293-6.
67. Wu YT, Luo HL, Johnson DR. Effect of nickel sulfate on cellular proliferation and Epstein-Barr virus antigen expression in lymphoblastoid cell lines. *Cancer Lett* 1986; 32: 171-9.
68. Armstrong RW, Imery PB, Lye MS, Armstrong MJ, Yu MC, Sani S. Nasopharyngeal carcinoma in Malaysian Chinese: occupational exposures to particles, formaldehyde and heat. *Int J Epidemiol* 2000; 29:991-8.
69. Traserra J. Tumores malignos de la rinofaringe. En Abelló P, Traserra J. ed. *Otorrinolaringología*. 1992; 448-455. 1º ed. Ediciones Doyma S.A. Barcelona.
70. Feinmesser R, Miyazaki I, Cheung R, Freeman JL, Noyek AM, Dosch HM. Diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by DNA amplification of tissue obtained by fine needle aspiration. *N Engl J Med* 1992; 326:17-21.
71. Grotts BF. Transitional cell carcinoma of the nasopharynx in a child. *Laryngoscope* 1949; 59: 1355-9.
72. Laing D. Nasopharyngeal carcinoma in the Chinese in Hong Kong. *Trans Am Acad Ophtal Otolaryngol* 1967; 71: 934-50.
73. Mc Dermoth AL, Dutt SN, Watkinson JC. The aetiology of nasopharyngeal carcinoma. *Clin Otoralynol* 2001; 26: 82-92.

74. Bray F, Haugen M, Moger TA, Tretli S, Aalen O, Grotmol T. Age incidence curves of Nasopharyngeal Carcinoma Worldwide: Bimodality in Low-Risk Populations and Aetiologic Implications. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 2356-65.
75. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108.
76. Curado MP, Edwards B, Shin HR, Storm H, Ferlay J, Heanue M et al. Cancer incidence in five continents. Vols IX. IARC Scientific Publications N° 160. Lyon: IARC; 2007
77. Fleming ID, Sham JS, Kwong DL, Au GK, Choy DT. Retropharyngeal lymphadenopathy in patients with nasopharyngeal carcinoma: a computed tomography-based study. *Cancer* 1997; 79: 869-77.
78. Lobin LH, Wittekind CH. International Union Against Cancer (UICC): TNM classification of malignant tumours. 1997. 5<sup>th</sup> ed. New York: Wiley-Liss.
79. Sham JS, Choy D, Wei WI. Nasopharyngeal carcinoma: orderly neck node spread. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1990; 19: 929-933.
80. Teo PM, Kwan WH, Lee WY, Leung SF, Johnson PJ. Prognosticators determining survival subsequent to distant metastasis from nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1996; 77: 2423-2431.
81. Friedrich E, Friedrich S, Lobeck H, Niedobitek G, Arps H. Epstein-Barr virus DNA and epithelial markers in nasopharyngeal carcinoma. *Med Microbiol Immunol* 2003; 192: 141-144.
82. Spano JP, Busson P, Atlan D, Bourhis J, Pignon JP, Esteban C et al. Nasopharyngeal carcinomas: an update. *Eur J Cancer* 2003; 39: 2121-35.
83. Andrea T, Deuryp MD. Epstein Barr virus associated epithelial and mesenchymal neoplasms. *Human Pathology* 2008; 39: 473-483.
84. Song-Qing F, Jian M, Jie Z, Wei X et al. Differential expression of Epstein Barr virus encoded RNA and several tumor related genes in various types of nasopharyngeal epithelial lesions and nasopharyngeal carcinoma using tissue microarray analysis. *Human Pathology* 2006; 37: 593-605.
85. Vokes EE, Liebowitz DN, Weichselbaum R. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 1997, 350: 1087-91.

86. Cvitokovic E, Bachouchi M, Armand JP. Nasopharyngeal carcinoma: biology, natural history and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991; 5: 821-23.
87. Decaussin G, Lammali F, Turenne-Tessier M et al. Expression of BARP1 gene encoded by Epstein-Barr virus in nasopharyngeal carcinoma biopsies. *Cancer Res* 2000; 60: 5584-88.
88. Lammali F, Clause B, Ardila-Osorio H et al. Control of apoptosis in Epstein Barr virus positive nasopharyngeal carcinoma cells. Opposite effects of CD95 and CD40 stimulation. *Cancer Res* 1999; 59: 924-30.
89. Preciado M, Chabay P, Matteo E et al. Epstein Barr virus associated pediatric nasopharyngeal carcinoma: its correlation with p53 and bcl 2 expression. *Med Pediatr Oncol* 2002; 38: 345-48.
90. Tsai S, Jin Y, Mann R, Ambinder R. Epstein-Barr virus detection in nasopharyngeal tissues of patients with suspected nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 1998; 82: 1449-53.
91. Yu M, Henderson B. Nasopharyngeal cancer. In: Scottenfeld D, Fraumeni J (Eds) *Cancer epidemiology and prevention*. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford Univ. Press, New York 1996; 603-618.
92. Yung M, Ming T, Chia L, Hsuan Y, Tsui L, Wei C, Cheng H. Sinonasal undifferentiated carcinoma and nasopharyngeal type undifferentiated carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2002; 26: 371- 376.
93. Hila L, Farah F, Ayari H, Ferjaoui M, Dehria W, Ben Jilani S. Epidemiological study, immunohistochemistry and *in situ* hybridization studies of nasopharyngeal carcinomas: A Tunisian report. *Pathol Biol* 2009; 57: 427-9.
94. Dawson CW et al. Epstein Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* 2003; 278: 3694-704.
95. Cerilli L, Holst V, Brandwein M, Stoler M, Mills S. Sinonasal Undifferentiated Carcinoma. Immunohistochemical profile and lack of EBV association. *Am J Surg Pathol* 2001; 25: 156-163.
96. Zubizarreta P, D'Antonio G, Raslawski E, Gallo G, Preciado M, Casak S, Scopinaro M, Morales M. Nasopharyngeal carcinoma in childhood and adolescence. *Cancer* 2000; 89: 690-695.

97. Niedobitek G, Agathangelou A, Barber P et al. p53 overexpression and Epstein Barr virus infection in undifferentiated and squamous cell nasopharyngeal carcinomas. *J Pathol* 1993; 170: 457-461.
98. Khouvidou C, Kanavaros P, Papaioannou D et al. Expression of bcl2 and p53 proteins in nasopharyngeal carcinoma. Absence of correlation with the presence of EBV encoded EBER1-2 transcripts and latent membrane protein-1. *J Clin Pathol Mol Pathol* 1995; 48: M17-M22.
99. Porter M, Field J, Lee J et al. Detection of the tumor suppressor gene p53 in nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong Chinese. *Anticancer Res* 1994; 14: 1357-1360.
100. Sheu L, Chen A, Tseng H et al. Assessment of p53 expression in nasopharyngeal carcinoma. *Hum Pathol* 1995; 26: 380-386.
101. Davi F, Delecluse HJ, Guet P et al. Burkitt-like lymphomas in AIDS patients: Characterization with a series of 103 human immunodeficiency virus-associated non-Hodgkin's lymphomas. *J Clin Oncol* 1998; 16: 3788-3795.
102. Shibata D, Weiss LM, Nathwani BN et al. Epstein-Barr virus in benign lymph node biopsies from individuals infected with the human immunodeficiency virus is associated with concurrent or subsequent development of non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 1991; 77: 1527-1533.
103. Tao Q, Chan A. Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments. *Expert Rev Mol Med* 2007; May 4;9(12):1-24.
104. Huang DP et al. Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Genet cytogenet* 1991; 54: 91-99.
105. Huan DP et al. Cytogenetics of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma xenografts from southern Chinese. *Int J Cancer* 1989; 43: 936-939.
106. Wong et al. Molecular cytogenetic characterization of nasopharyngeal carcinoma cell and xenografts by comparative genomic hybridization and spectral karyotyping. *Cancer Genet cytogenetic* 2003; 140: 124-132.
107. Lo KW et al. High resolution allelotyping of microdissected primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 2000; 60: 3348-3353.
108. Huang DP et al. A region of homozygous deletion on chromosome 9p21-22 in primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 4003-4006.

109. Hui AB et al. Array-based comparative genomic hybridization analysis identified cyclin D1 as a target oncogene at 11q13.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2005; 65; 8125-33.
110. Burgos JS, Vera Sempere FJ. Analysis of EBV latency by EBER in situ Hybridization in nasopharyngeal carcinoma in Spanish patients. *Anticancer Res.* 2001; 21; 3921-4.