



**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

**Facultad de Medicina**

**Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y  
Educación Física y del Deporte**

**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA  
TOPOISOMERSA II ALFA EN PACIENTES  
CON CARCINOMA NASOFARÍNGEO**

**ÁNGEL BANDERA LÓPEZ**


**Málaga, 2017**





UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

AUTOR: Ángel Bandera López

 <http://orcid.org/0000-0001-6112-8786>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer obras derivadas.

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de Málaga (RIUMA): [riuma.uma.es](http://riuma.uma.es)





**UNIVERSIDAD DE MÁLAGA**

Facultad de Medicina

Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana,  
Anatomía Patológica y Educación Física y del Deporte

**Prof. Dr. D. Luis Vicioso Recio**, Profesor titular del Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y Educación Física y del Deporte de la Facultad de Medicina de Málaga y Jefe del Sección de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga.

**Dr. D. Óscar E. Cazorla Ramos**, facultativo especialista de área del servicio de Otorrinolaringología, sección Oncología de Cabeza y Cuello, del Hospital Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga e Investigador del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA).

**Dr. D. Jaime Gómez-Millán Barrachina**, facultativo especialista de área del servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga e Investigador del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA).

#### **CERTIFICAN:**

Que Don Ángel Bandera López, ha realizado personalmente y bajo nuestra dirección el trabajo de Tesis Doctoral “**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE LA TOPOISOMERSA II ALFA EN PACIENTES CON CARCINOMA NASOFARÍNGEO**”, que ha sido concluido con todo aprovechamiento, habiendo los que suscriben revisado esta Tesis y estando conformes con su presentación para ser juzgada.

Prof. Dr. D Luis Vicioso

Dr. Óscar Cazorla

Dr. Jaime Gómez-Millán



**A mi familia**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al **Prof. Dr. D. Luis Vicioso Recio**, Profesor titular del Departamento de Fisiología Humana, Histología Humana, Anatomía Patológica y Educación Físico Deportiva de la Facultad de Medicina de Málaga y Jefe del Sección de Anatomía Patológica del Hospital Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga, por brindarme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

Al **Dr. D. Cazorla Ramos**, facultativo especialista de área del servicio de Otorrinolaringología, sección Oncología de Cabeza y Cuello, del Hospital Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga e Investigador del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), por motivarme, apoyarme e instruirme desde el inicio de este proyecto que no hubiera llegado a término sin su ayuda.

Al **Dr. D. Jaime Gómez-Millán Barrachina**, facultativo especialista de área del servicio de Oncología Radioterápica del Hospital Universitario “Virgen de la Victoria” de Málaga e Investigador del Instituto de Investigación Biomédica de Málaga (IBIMA), por su tiempo y su dirección concisa y sincera que ha hecho posible esta tesis doctoral.

A la **Dra. Martina Álvarez Pérez** por su ayuda amable y constante en el estudio estadístico de esta tesis y por sus consejos.

A la **Dra. M<sup>a</sup> Dolores Aguilar Conde**, por su ayuda para localizar las muestras del Hospital Costa del Sol.

Al **Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Victoria”** por su colaboración en todo momento.

A los **Servicios de Oncología Médica y Oncología Radioterápica del Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Victoria”** por su labor en el tratamiento de los pacientes de este estudio.

A los compañeros del **Servicio de Otorrinolaringología del Hospital Clínico Universitario “Virgen de la Victoria”** por ser mi familia profesional y darme tantos momentos de alegría.

A **Cristina** por comprenderme y estar junto a mí.

A **mi familia** por todo.

A todos **los pacientes** oncológicos y sus familiares, que deben ser estímulo para una medicina honesta.



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**ÍNDICE**



<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
1. EPIDEMIOLOGÍA.....	4
2. ANATOMÍA PATOLÓGICA.....	7
2.1. Carcinoma epidermoide.....	8
2.1.1. Carcinoma escamoso queratinizante.....	8
2.1.2. Carcinoma escamoso no queratinizante.....	9
2.1.3. Carcinoma escamoso de células basaloideas.....	9
2.2. Adenocarcinoma papilar.....	10
2.3. Carcinoma de tipo glándula salivar.....	11
3. ETIOPATOGENIA.....	12
3.1. Factores genéticos.....	12
3.2. Factores ambientales.....	15
3.3. Virus Epstein-Barr.....	16
3.3.1. Estructura del VEB.....	17
3.3.2. Papel del VEB en la patogénesis del carcinoma nasofaríngeo... 18	
4. TRATAMIENTO EN CARCINOMA NASOFARINGEO.....	20
4.1. Técnicas de tratamiento.....	20
4.1.1. Radioterapia (RT).....	20
4.1.2. Quimioterapia (QT).....	23
4.1.3. Cirugía.....	24
4.2. Tratamiento del cáncer precoz de nasofaringe.....	25
4.2.1. RT externa.....	25
4.2.2. Cirugía.....	26

4.3. Tratamiento del cáncer localmente avanzado de nasofaringe.....	27
4.3.1. RTQT concomitante.....	27
4.3.2. RTQT concurrente seguida de QT adyuvante.....	32
4.3.3. Quimioterapia de inducción seguida de RT +/- QT.....	33
4.3.4. Radioterapia exclusiva.....	34
4.4. Tratamiento de la enfermedad recurrente.....	34
4.4.1. RT externa.....	35
4.4.2. RTQT combinadas.....	37
4.4.3. Braquiterapia.....	38
4.4.4. RT esterotáxica.....	39
4.4.5. Cirugía.....	40
4.5. Desarrollo clínico de la terapia dirigida en carcinoma nasofaríngeo.....	47
4.5.1. Alteraciones moleculares en carcinoma nasofaríngeo.....	47
4.5.2. Factor de crecimiento epidérmico.....	48
4.6.3. Angiogénesis tumoral.....	49
4.5.4. La modulación epigenética.....	51
5. FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS.....	53
5.1. Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.....	54
5.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular.....	56
5.3. p53.....	59

5.4. p16.....	60
5.5. Vía de señalización Wnt.....	62
5.6. MicroARN en carcinoma nasofaríngeo.....	63
<b>6. TOPOISOMERASA II ALFA.....</b>	<b>66</b>
6.1. Topoisomerasas y su función.....	66
6.2. Tipos de topoisomerasas.....	66
6.3. Alteraciones y consecuencias: TOPOIIA como enzima genotóxica.....	68
6.4. Topoisomerasa y Cáncer.....	69
6.4.1. Adenocarcinoma de Mama.....	70
6.4.2. Carcinoma No Microcítico de Pulmón.....	72
6.4.3. Adenocarcinoma de colón.....	72
6.4.4. Hepatocarcinoma.....	73
6.4.5. Sarcomas de partes blandas.....	74
6.5. Topoisomerasa II alfa y carcinoma de nasofaringe.....	75
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>77</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>79</b>
1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA SERIE.....	79
1.1. Criterios de inclusión.....	79
1.2. Criterios de exclusión.....	80

1.3. Protocolos terapéuticos.....	80
1.4. Seguimiento.....	82
2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUIMICO.....	84
3. ANALISIS ESTADISTICO.....	88
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>92</b>
1. ESTADISTICA DESCRIPTIVA.....	92
1.1. Características generales de la muestra.....	92
1.2. Características tumorales.....	92
1.3. Características histológicas.....	95
1.4. Estudio de la topoisomerasa II alfa.....	95
1.5. Tratamiento y evolución clínica.....	96
2. ESTADISTICA ANALÍTICA.....	99
2.1. Inmunohistoquímica.....	99
2.2. Evolución clínica y supervivencia.....	102
2.2.1. Supervivencia Global.....	102
2.2.2. Tiempo libre hasta la progresión.....	107
2.2.3 Supervivencia global relacionada con la edad.....	109
2.2.4. Supervivencia global relacionada con el género.....	109
2.2.5. Supervivencia global relacionada con el hábito tabáquico.....	109
2.2.6. Supervivencia global relacionada con las categorías TNM.....	110
2.2.7. Supervivencia global relacionada con Estadio.....	110
2.2.8. Supervivencia global relacionada con características clínico-radiológicas.....	111

2.2.9. Supervivencia global relacionada con el tipo histológico.....	111
2.3. Análisis multivariante.....	112
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>114</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>121</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>124</b>
<b>VIII. ANEXO I.....</b>	<b>166</b>
<b>IX. ANEXO II.....</b>	<b>169</b>
<b>X. ANEXO III.....</b>	<b>182</b>



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

## I. INTRODUCCIÓN

El carcinoma nasofaríngeo (CNF) es una neoplasia maligna única en cabeza y cuello por su epidemiología, factores de riesgo, distribución y tratamiento. Debido a su localización, no es habitualmente resecable por su proximidad a la base del cráneo.

Históricamente ha sido tratado con radioterapia, y aunque a pesar de que las tasas de curación para la enfermedad en estadios tempranos han sido relativamente buenas, nos hallábamos ante peores resultados en casos de enfermedad avanzada tanto locorregional como diseminada.

Ante esta dificultad, se propuso el uso de quimioterapia simultánea con radioterapia, popularizado por el ensayo Intergroup INT0099 <sup>1</sup>, que demostró la mejoría de la supervivencia en la enfermedad avanzada. Este hecho puso en evidencia que ambas terapias podían combinarse entre sí para el tratamiento de la enfermedad avanzada y dio lugar a una mejora tanto de la radioterapia como de la quimioterapia, disminuyendo la toxicidad en la medida de lo posible hasta el momento actual.

Del mismo modo, los avances técnicos en radioterapia, en particular el desarrollo de la planificación mediante imágenes de tomografía computerizada (TC) y la radioterapia de intensidad modulada (IMRT), optimizaron la precisión de las radiaciones centrándolas en los tejidos patológicos y respetando los tejidos sanos, que en relación con la localización de la nasofaringe son zonas donde encontramos órganos críticos.

Sin embargo, como ocurre en cualquier campo donde hay una rápida evolución, surgen numerosas preguntas sin respuesta y controversias como pueden ser: el cronograma óptimo, cuándo iniciar la quimioterapia, qué

quimioterápico utilizar, la delimitación de los volúmenes ideales para la IMRT, etc.

Actualmente, la evolución reciente de la biotecnología molecular anuncia la posibilidad de un mejor diagnóstico y/o tratamiento de manera más individualizada de esta enfermedad.

Ante todos estos avances, el oncólogo no puede esperar a estas respuestas, debe adoptar un espíritu innovador, interesarse por los grandes cambios y actualizarse para poder ofrecer a sus pacientes el mejor tratamiento, individualizando las terapias y siguiendo los grandes avances pero siendo cauto.

Es evidente que, con todas estas variantes de tratamientos y desafíos científicos, una buena comprensión de los conocimientos actuales sobre el carcinoma nasofaríngeo es esencial.

Por ello, se inició este trabajo en el que han colaborado oncólogos médicos, oncólogos radioterapéuticos, otorrinolaringólogos, patólogos y radiólogos para proporcionar una amplia revisión de todos los conceptos concernientes al carcinoma nasofaríngeo y a sus avances en el manejo del tratamiento.



## 1. EPIDEMIOLOGÍA:

El carcinoma de nasofaringe es un tumor con una distribución étnica y geográfica particular.

En el año 2012, se registraron 87.000 casos nuevos de carcinoma de nasofaringe en el mundo (el 0,6% de todos los tumores) <sup>2</sup>, con una distribución respecto al género de 2,3:1 a favor de los varones (varones 61.000 y mujeres 26.000) <sup>2</sup>. De estos casos, el 80% pertenecía a China, Sudeste Asiático y otros países asiáticos <sup>2</sup>. En cuanto a la mortalidad en 1 año desde el diagnóstico, comprendía unos 51.000 casos (36.000 varones y 15.000 mujeres), lo que en porcentaje se puede expresar como un 0,6 % aproximadamente <sup>2</sup>.

Existe una gran variación geográfica en la incidencia de estas neoplasias, con predominio por los países del Sudeste Asiático, así podemos diferenciar tres áreas geográficas:

- Zonas de alto riesgo, con una incidencia superior a 15 casos/100.000 habitantes/año. Corresponden al sur de China, Taiwán, Sudeste Asiático, algunos países del Norte de África, Groenlandia y Alaska <sup>3</sup>. Destacan dos núcleos: la provincia de Guangdong y los inuits de Alaska, cuya incidencia es 25-50 casos y 15-20 casos por 100.000 habitantes/año <sup>4</sup>.
- Zona de riesgo intermedio, con una incidencia entre 5-7 casos/100.000 habitantes/año. Incluye el Magreb (Marruecos, Túnez, Argelia e Israel), así como otros países africanos, como Kenia, Uganda, Tanzania y Sudán, y Alaska <sup>3</sup>.

- Zonas de bajo riesgo, con una incidencia próxima a 1 caso/100.000 habitantes/año. Incluye el resto del mundo, con una ligera mayor incidencia en la Polinesia francesa, la población afroamericana de EE.UU., Zimbabue e Israel, afectando en este caso a la población judía nacida en África, Asia y Alaska <sup>3</sup>.

En lo que respecta al tipo histológico, la distribución también es diferente puesto que en las zonas endémicas predomina el carcinoma nasofaríngeo indiferenciado con un 95%. Mientras en zonas no endémicas como Norte América la distribución es: carcinoma escamoso queratinizado 25%, carcinoma no queratinizado diferenciado 12% e indiferenciado 63% <sup>5,6</sup>.

Europa se encuentra dentro de la zona de bajo riesgo de incidencia de carcinoma nasofaríngeo. Durante el año 2012, se diagnosticaron 2.900 casos en varones y 1.200 en mujeres, teniendo una tasa de 0,8 casos/100.000 habitantes/año. En cuanto a la mortalidad, se registraron 21.000 casos con una tasa de mortalidad de 0,4 muertes/100.000/año <sup>2</sup>.

En España, durante el año 2012, se detectaron 350 casos nuevos de este tipo de carcinoma (0,2% de todos los tumores). En cuanto a su distribución por género, fue la siguiente: varones 253 y mujeres 97. La mortalidad durante ese año fue de 188 casos (varones 138 y mujeres 50), lo que supone el 53% <sup>2</sup>.

En el hospital Virgen de la Victoria, en el periodo 1997-2011, se diagnosticaron 32 casos de carcinoma de nasofaringe, mientras que el Hospital Costa del Sol, desde 2003 a 2011, se diagnosticaron 21 casos.

Durante 2011, el último año en el que se incluyeron pacientes en este trabajo, en el Hospital Virgen de la Victoria se registraron 7 casos y en el Hospital Costa del Sol 4 casos.

## 2. ANATOMÍA PATOLÓGICA:

A diferencia de los que ocurre en otras localizaciones como la laringe, en el carcinoma de nasofaringe no existen lesiones precursoras claramente establecidas. La única lesión precursora descrita es el carcinoma nasofaríngeo (CNF) *in situ*, que actuaría como lesión previa al CNF invasivo, y aunque es un concepto bien definido, no es fácilmente reconocible en la práctica clínica. Se han utilizado varios sinónimos para este concepto: atipia, displasia, carcinoma *in situ*, y neoplasia intraepitelial nasofaríngea<sup>6, 7, 8</sup>.

La presencia del carcinoma *in situ* en la literatura es muy variable, encontrando esta lesión con una incidencia que oscila desde el 3% al 73% de las neoplasias de nasofaringe<sup>7, 8</sup>, una variabilidad que puede atribuirse en parte a la falta previa de criterios consolidados.

Al igual que ocurre en el CNF invasivo, en las células neoplásicas del carcinoma *in situ* se encuentra la presencia de virus de Epstein-Barr (VEB), mientras que el epitelio nasofaríngeo no neoplásico es negativo para la detección del mismo. Otros estudios de la expresión de marcadores en CNF han demostrado un nivel intermedio de expresión de proteínas antiapoptóticas, Bcl-2 y ciclooxigenasa-2 en el CNF *in situ* en comparación con el epitelio no neoplásico y tumores invasivos. Tales hallazgos de biomarcadores tienden a apoyar la relación de CNF *in situ* como lesión precursora<sup>9, 10</sup>.

Mientras que la mayoría de casos de CNF *in situ* son identificados como coexistente con un CNF invasivo, han sido registrados también, algunos casos de progresión del CNF *in situ* a invasivo<sup>11</sup>.

En la clasificación histológica del CNF según la OMS <sup>12</sup>, se distinguen tres tipos:

- Carcinoma epidermoide de nasofaringe
- Adenocarcinoma Papilar de nasofaringe
- Carcinoma de tipo glándula salivar

### **2.1. Carcinoma epidermoide de Nasofaringe**

El carcinoma nasofaringe es una neoplasia maligna con una distribución geográfica especial, descrita en apartados previos, existiendo zonas de alto, intermedio y bajo riesgo.

Dentro de este grupo podemos diferenciar tres subtipos:

- Carcinoma escamoso queratinizante
- Carcinoma escamoso no queratinizante: Diferenciado e Indiferenciado
- Carcinoma escamoso de células basaloides

#### **2.1.1. Carcinoma escamoso queratinizante**

Se trata de una neoplasia poco común en regiones endémicas. En dichas zonas, como Singapur, constituye entre el 1% y 20% de todos los casos <sup>13, 10</sup>.

En cambio, la proporción de este subtipo en zonas no endémicas se ha descrito hasta en un 67% de los casos <sup>14</sup>.

Este tipo se caracteriza por una diferenciación epidermoide evidente, con puentes intercelulares y depósitos de queratina de aspecto perlado <sup>15</sup>.

### 2.1.2. Carcinoma Escamoso No Queratinizante

Dentro de este grupo se encuentra dos subtipos: carcinoma no queratinizante diferenciado y el carcinoma indiferenciado.

El carcinoma no queratinizante diferenciado representa el 15-20% de los casos <sup>15</sup>. La diferenciación epidermoide no es evidente. Las células tumorales presentan una disposición estratificada no sincitial, mostrando contornos regulares y netos, con un aspecto pavimentoso y ausencia de secreción de mucina o de diferenciación celular <sup>15</sup>.

El carcinoma indiferenciado (también llamado linfoepitelioma) es el tipo más frecuente en las zonas endémicas. 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 este subtipo <sup>15</sup>.

### 2.1.3. Carcinoma escamoso de células basaloides

El carcinoma de células escamosas basaloides en la nasofaringe, tiene las mismas características morfológicas que en otras localizaciones de cabeza y cuello. Como su nombre indica tiene dos componentes, células basaloides y células escamosas. Las células basaloides son pequeñas, con núcleos hipercromáticos sin nucléolos y escaso citoplasma. A diferencia del carcinoma escamoso, contiene pequeños espacios quísticos con PAS y material positivo para *Alcian Blue* e hialinización del estroma <sup>16, 17</sup>. Este tipo histológico se asocia a un componente escamoso que puede ser carcinoma in situ o queratinizante

invasivo. También se puede presentar como una diferenciación escamosa focal dentro de las islas tumorales basaliodes. La conexión entre las células escamosas y basaliodes puede ser abrupta <sup>18</sup>.

Las metástasis pueden demostrar carcinoma basaloide, carcinoma escamoso, o ambos <sup>19</sup>.

## **2.2. Adenocarcinoma papilar de nasofaringe**

Se trata de un adenocarcinoma de bajo grado que se caracteriza por un crecimiento exofítico que forma ejes papilares y estructuras glandulares.

Este tipo de tumor es extremadamente raro <sup>20</sup>.

Esta neoplasia aparece con mayor frecuencia en edades entre 11-64 años (media de 37 años) y su distribución es igual entre hombres y mujeres <sup>21</sup>.

Macroscópicamente, se muestran como tumores blandos, exofíticos, con formas de papilas, polipoide, o coliflor <sup>22</sup>.

Microscópicamente se observa ejes conectivos fibrovasculares recubiertos por células epiteliales que conforman papilas <sup>22</sup>.

Es una neoplasia maligna de bajo grado, sin potencial metastásico, con excelente pronóstico si se consigue una cirugía radical <sup>21</sup>.

### **2.3. Carcinoma de tipo glándula salivar**

La incidencia de este tipo histológico en la nasofaringe es muy baja <sup>23</sup>. Afecta más a hombres en una proporción 3:1 <sup>24</sup>.

Es una neoplasia que aparece con un rango de edad de 15 a 74 años, con media de 50 años. Los tipos por orden de frecuencia son: el carcinoma adenoide quístico, carcinoma mucoepidermoide y adenocarcinoma <sup>25</sup>. Estas neoplasias se diagnostican en un estadio avanzado con frecuencia y a menudo con invasión de la base del cráneo, extensión intracraneal y afectación de nervios craneales.

Las características microscópicas son similares a las presentadas en otras localizaciones <sup>25, 26</sup>.

Otros carcinomas de tipo glándula salival de la nasofaringe incluyen carcinoma epitelial-mioepitelial <sup>27</sup>, carcinoma mioepiteliales <sup>28</sup>, el carcinoma de células acinares <sup>29</sup> y el adenocarcinoma polimorfo de bajo grado <sup>30</sup>.



### **3. Etiopatogenia**

Como ya hemos comentado anteriormente, el carcinoma de nasofaringe es único frente a otros tumores de la región otorrinolaringológica, ya que presenta una distribución y factores de riesgos muy particulares, con escasa relevancia de los hábitos tóxicos, los cuales son muy importantes en otros tumores cabeza y cuello.

A continuación, expondremos en cada apartado los distintos factores de riesgo que se han estudiado en relación con la aparición del carcinoma de nasofaringe.

#### **3.1. Factores genéticos**

El carcinoma de nasofaringe es uno de los cánceres más comunes en el sudeste de Asia, incluyendo áreas como el sur de China, Hong Kong, Singapur, Malasia y Taiwán. La incidencia en estos países varía de 10 a 53 casos por cada 100.000 personas. La incidencia también es alta entre los esquimales de Alaska y Groenlandia y en los tunecinos, que van desde 15 a 20 casos por cada 100.000 personas <sup>31</sup>.

La agrupación familiar de este tumor ha sido ampliamente observada tanto en la población china <sup>32,33</sup>, como en la población no occidental <sup>34</sup>.

El riesgo familiar de este tumor es más alto que en cualquier otro tumor maligno de cabeza y cuello <sup>35</sup>. El riesgo relativo para familiares de primer grado es de aproximadamente 8,0 <sup>36</sup>. El alto riesgo en la población cantonesa, y en

las personas con antecedentes familiares, sugieren que la susceptibilidad determinada genéticamente puede desempeñar un papel importante en la etiología.

Una característica importante de los cánceres familiares es la aparición a edades tempranas<sup>33</sup>. Varios estudios indican la asociación de determinados halotipos de HLA con el desarrollo de este tipo de tumor<sup>37</sup>.

La mayoría de los estudios realizados entre la población china demostraron un aumento del riesgo para los individuos con HLA-A2<sup>37</sup>. Una investigación reciente detectó una asociación consistente entre el desarrollo de este neoplasia en la población china y el HLA-A2 (HLA-A \* 0207), en cambio, en la población caucásica el halotipo más prevalente fue HLA-A \* 0201, pero no se observó asociación con el desarrollo de esta neoplasia<sup>38</sup>. Los halotipos de HLA de AW19, BW46, y B17 han demostrado también mayor riesgo, mientras que HLA-A11 se asocia con una disminución del riesgo<sup>39</sup>.

Múltiples alteraciones en cromosomas se han mostrado como significativas en el desarrollo del carcinoma de nasofaringe, así como ocurre en otros tumores sólidos. El hallazgo de la translocación, amplificación, y delección de 3p, 5p, y 3q indica un “punto de ruptura” en el desarrollo de este tumor<sup>40,41</sup>. Otros puntos claves se han observado con frecuencia en 1p11-31, 3p12-21, 3q25, 5q31, 11q13, 12q13, y Xq25<sup>42</sup>. La inactivación de genes supresores de tumores en 3p, 9p, 11q, 13q, 14q, 16q y alteraciones de oncogenes en los cromosomas 8 y 12 son importantes en el desarrollo de este carcinoma<sup>43,44</sup>. La serie de Xiong et al, en el año 2004 orienta a la vinculación de este tumor con alteraciones en el cromosoma 3p, definiendo el locus de susceptibilidad en la región de 13.6

cM en el 3p21.31-21.2 <sup>45</sup>. Estos resultados están en consonancia con otros autores en el carcinoma de nasofaringe <sup>44, 46</sup>. Muchos de los genes supresores de tumores candidatos en esta región cromosómica han sido: CACNA2D2, DLC1, FUS1, H37, HYAL1, RASSF1A, SEMA3B, y SEMA3F y hMLH1 <sup>45</sup>.

Algunos trabajos apuntan a que los polimorfismos en los genes que metabolizan los carcinógenos están asociados con la susceptibilidad a este carcinoma. El citocromo P450 2E1 (CYP2E1) es responsable de la activación metabólica de nitrosaminas y carcinógenos relacionados con estas. Encontramos estudios de casos y controles que han demostrado una fuerte asociación de la variante de la CYP2E1 (alelo c2) con un mayor riesgo de esta enfermedad en la población china <sup>47,48</sup>.

La enzima glutatión S-transferasa M1 (GSTM1), que forma parte del grupo de fase II de desintoxicación hepática, participa como factor de riesgo sinérgico para el carcinoma de nasofaringe <sup>36, 49</sup>.

De igual modo se ha analizado la asociación de otros genes de reparación del ADN con la susceptibilidad a padecer un carcinoma de nasofaringe. Así, se ha observado una reducción del riesgo de padecer este tumor con el polimorfismo del gen XRCC1 (Arg280His), mientras que el polimorfismo del gen hOGG1 (Ser326Cys) demostró un mayor riesgo en la población de Taiwán <sup>50</sup>.

### **3.2. Factores ambientales**

Un gran número de estudios de casos y controles realizado en diversas poblaciones (cantoneses, sur de China, norte de China, y tailandeses) que residen en diferentes partes de Asia y América del Norte han confirmado que el pescado salado al estilo cantones y otras conservas, que contienen grandes cantidades de nitrosodimetilamina (NDMA), N-nitrosopirrolidilina (NPYR), y N-nitrosopiperidina (NPIP), pueden ser factores cancerígenos para esta neoplasia <sup>51, 52, 53, 54,55</sup>.

El consumo de pescado en salazón al estilo cantonés a edad temprana ha demostrado un alto riesgo de carcinoma de nasofaringe en el sur de China <sup>54</sup>. Además se disponen de estudios con animales donde tumores nasales y nasofaríngeos han sido inducidos en ratas con dietas basadas en pescado en salazón <sup>52,54</sup>.

Por otra parte, la exposición a combustión de madera, a formaldehído y el consumo de tabaco son factores de riesgo reconocidos <sup>56</sup>.

En un trabajo realizado en 2009, en una población del sudeste asiático, donde se comparó los distintos factores ambientales en individuos con VEB positivo con y sin carcinoma de nasofaringe (para evitar el factor del VEB), se concluyó que las personas expuestas a la combustión de madera durante 10 años presentaron un riesgo casi 6 veces mayor <sup>57</sup>.

Se sabe que el formaldehído causa tumores mediante la observación experimental en roedores. Un metaanálisis asocia la exposición al formaldehído con un incremento de 2 veces en el riesgo de CNF <sup>58</sup>.

En cuanto al tabaco, hay discrepancias. En un estudio de casos y controles sobre la población de EEUU se evidenció la relación entre el tabaco y el CNF de células queratinizadas, pero no con el CNF de células no queratinizadas <sup>57</sup>. Otros autores no encuentran relación estadísticamente significativa <sup>57</sup>.

### **3.3. Virus de Epstein Barr (VEB)**

Lloyd John Old describió por primera vez la relación entre VEB y el CNF en 1966, utilizando la hibridación in situ y la inmunofluorescencia de anticomplemento (ACIF) <sup>59</sup>. Otros autores posteriores demostraron la expresión de genes latentes del VEB en las células tumorales como son: antígeno nuclear del virus de Epstein-Barr (EBNA), proteína de membrana latente-1 (LMP-1), LMP-2, y ARNs no codificantes (Eber) <sup>60</sup>; confirmando la infección de células tumorales por VEB. Curiosamente, la expresión del antígeno temprano del VEB (Early Antigen) se correlaciona positivamente con el consumo de alimentos salados y en conserva, lo que sugiere que el desarrollo de VEB en esta neoplasia podría estar relacionado con los hábitos alimenticios <sup>61</sup>, y proporciona un punto más para los estudios epidemiológicos posteriores.

Aproximadamente el 90% de la población con carcinomas nasofaríngeos indiferenciados de todo el mundo tiene una serología positiva para VEB. En la mayoría de estos pacientes, los títulos de anticuerpos VEB son superiores que en las personas sin esta patología. Se ha constatado una asociación más consistente con los anticuerpos IgA para VEB. Por lo tanto, la medición de anticuerpos IgA específicos y anticuerpos contra ADNasa puede ser un método útil en el cribado para la detección precoz de este carcinoma <sup>62, 63</sup>.

La infección por VEB es un evento temprano, posiblemente inicial en el desarrollo del CNF <sup>7</sup>. Una hipótesis actual propone que VEB juega un papel crítico en la transformación del epitelio nasofaríngeo en células tumorales <sup>64, 65</sup>, encontrando que los tumores positivos para VEB tienen un crecimiento más rápido que los tumores negativos.

Las lesiones preinvasivas de la nasofaringe se infectan con este virus y esta infección precede a la expansión clonal de las células malignas <sup>66</sup>. Se piensa que el VEB contribuye, al menos en parte, a la patogénesis general de este carcinoma. Muchas investigaciones han demostrado que, en los carcinomas de nasofaringe indiferenciados, la positividad del VEB parece ser un hecho constante, independientemente de su origen geográfico <sup>67, 68</sup>.

### 3.3.1. Estructura del VEB

El VEB es un virus  $\gamma$ -herpes <sup>69</sup> presente en más del 90% de los adultos en todo el mundo. Es un miembro del género linfocriptovirus.

El genoma de este virus es grande, superando los 172 kb pares de bases en un ADN lineal de doble cadena. Fue el primer herpesvirus al que se secuenció su código genético de manera completa <sup>70</sup>.

En el ciclo de este virus, no se replican ni producen viriones, sino que utiliza la ADN polimerasa del huésped para replicar su material genético, que queda como un episoma extracromosómico <sup>71</sup>.

### 3.3.2. Papel del VEB en la patogénesis del Carcinoma de Nasofaringe

Aproximadamente el 90% de la población adulta en todo el mundo es VEB positivo por serología <sup>64</sup>. Después de una infección en la infancia, el virus continúa de manera latente en algunas células B en reposo, pero esto no ocurre en el epitelio de la nasofaringe de los individuos sanos <sup>72, 73</sup>, sin embargo, la infección latente se ha demostrado en carcinomas in situ de la nasofaringe <sup>74</sup>. Estos hallazgos sugieren que la infección por VEB se lleva a cabo antes de que comience el crecimiento invasivo, pero probablemente no representa el primer paso en la patogénesis. Las proteínas latentes de este virus incluyen los seis antígenos nucleares (EBNAs 1, 2, 3A, 3B y 3C, y EBNA-LP) y tres proteínas de membrana latentes (LMPS 1, 2a, 2b). EBNA-LP se transcribe a partir de un número variable de exones repetitivos. LMP2A y LMP2B se componen de múltiples exones localizados a cada lado de la región de repeticiones terminales (TR), que se forma durante la circulación del ADN lineal para producir el episoma viral. EBER1 y EBER2 son altamente transcritas en ARN no poliadenilado y su transcripción es una característica constante de la infección latente. Una propiedad biológica fundamental del virus es la capacidad de alterar el crecimiento de linfocitos B in vitro, lo que lleva a la transformación de crecimiento permanente. La entrada en los linfocitos B está mediada principalmente por la unión de una glicoproteína de la envoltura viral, gp350 / 220 (gp350), al receptor CD21 en la superficie de las células B <sup>75</sup>, y por medio de la unión de una segunda glicoproteína, gp42, a moléculas HLA de clase II como un correceptor <sup>76</sup>. Este virus codifica más de 100 genes, al menos diez genes son para su replicación, y los genes virales incluyen tres proteínas integrales de membrana <sup>77, 78, 79, 80</sup>.

Estas proteínas virales producen la immortalización celular y transformación maligna por diversos mecanismos de señalización. Por ejemplo, LMP1 es una proteína de membrana que activa múltiples vías de señalización y factores de transcripción, incluyendo el factor nuclear-kappaB (NF-kB). La activación de NF-kB es necesaria para el linfoma (células de Reed-Sternberg), haciendo que las células proliferen e inhiban la apoptosis<sup>81</sup>. Además, la activación de NF-kB es esencial para la immortalización de células B y la transformación mediada por LMP1 de los fibroblastos<sup>82</sup>. Para entender las propiedades patogénicas de VEB en este carcinoma, se ha determinado el estado de la infección y la expresión de genes virales en muestras de biopsia de este tumor<sup>71</sup>.



## **4. TRATAMIENTO**

La radioterapia ha sido tradicionalmente considerada como el tratamiento de elección en el cáncer de cavum, obteniendo cifras de supervivencia en estadios I y II de un 90% y un 85% respectivamente. Sin embargo, las tasas de supervivencia obtenida en estadios más avanzados (III-IV) se consideran subóptimas, con tasas de recidiva local de 50-80% y un riesgo alto de metástasis a distancia. Por ello, en este grupo de pacientes se han estudiado combinaciones de radioterapia y quimioterapia que han mejorado su pronóstico

83, 84, 85, 86, 87, 88

### **4.1. Técnicas de tratamiento**

#### **4.1.1. Radioterapia**

##### **Radioterapia en 2D**

Tradicionalmente, la radioterapia en 2D se basaba en la aplicación de la radiación mediante dos campos laterales, y un campo anteroposterior, irradiando los ganglios cervicales y supraclaviculares respectivamente. Los límites de estos campos se establecían mediante referencias óseas en placas de simulación ortogonales. La aplicación de dos campos laterales implicaba la irradiación de un volumen amplio de tejido sano, como por ejemplo las glándulas parótidas.

Radioterapia 3D

Con la disponibilidad de tomografía computerizada (TC), se desarrolló una mayor precisión para delimitar la extensión de la enfermedad y a finales de la década de los 80s, la información 3D de estas exploraciones se incorporó de forma rutinaria a la planificación del tratamiento radioterápico.

Radioterapia de Intensidad Modulada (IMRT)

La radioterapia por intensidad modulada consiste en un tratamiento que modula o controla la intensidad del haz de radiación, obteniendo una alta conformación de la dosis de radiación sobre el tumor, evitando la irradiación de estructuras críticas en mayor medida que con la radioterapia en 3D. Para ello utiliza aceleradores lineales con colimador multiláminas y sofisticados sistemas informáticos de planificación dosimétrica y verificación de dosis.

Distintos autores han publicado series clínicas describiendo su experiencia con la IMRT en el cáncer de nasofaringe <sup>89, 90, 91, 92</sup>.

Wolden et al, publicaron unas tasas de xerostomía en pacientes tratados con IMRT de 42% grado 1, 32% grado 2, ningún caso de grado 3 y el 26% sin xerostomía <sup>93</sup>. Lee et al en la Universidad de California San Francisco (UCSF), registraron su experiencia con IMRT para el CNF; a los 2 años de la finalización del tratamiento, el 66% no padeció xerostomía, 32% con grado 1, y sólo 1 paciente de 41 que fueron evaluados presentó un grado 2 <sup>94</sup>.

En un ensayo aleatorizado realizado por Pow y cols, sobre la xerostomía y la calidad de vida después de IMRT en comparación con RT convencional en 2D, objetivaron que tras IMRT, el tiempo de recuperación del flujo salival estimulado fue significativamente más rápido. Por otra parte, la calidad de vida

relacionada con la xerostomía también mejoró significativamente en el grupo de tratamiento IMRT <sup>95</sup>.

Distintos autores han demostrado que la disminución de la toxicidad con la IMRT se acompaña de un alto control locorregional. Lee et al, realizaron un estudio retrospectivo en 67 pacientes tratados con IMRT. La supervivencia a los 4 años libre de progresión local y la tasa de supervivencia libre de progresión fueron del 97% y 98% respectivamente <sup>94</sup>. Dos años después de esta investigación, Kwong et al y Kam et al, publicaron sus resultados con IMRT, siendo similares a los conseguidos por Lee et al <sup>91, 96</sup>. Por último, Wolden y cols. reportaron una tasa de control local a los 3 años del 91%, un control regional del 93%, supervivencia libre de enfermedad 67% y supervivencia global 83%. En estadios precoces (T1 o T2) consiguieron 100% de control local, mientras que estadios más avanzados como T3 y T4 presentaron una tasa de control local del 83% <sup>93</sup>.

El ensayo RTOG 02-25 incluyó 68 pacientes con CNF con estadios I-IVb, de los que el 94% eran carcinomas queratinizantes. Se realizó tratamiento con IMRT siguiendo el esquema habitual (fraccionamientos estándar en fracciones de 2 Gy diarios hasta completar 70 Gy). Los pacientes con ganglios positivos o criterios T avanzados recibieron quimioterapia concomitante, así como la quimioterapia adyuvante. Los resultados a los dos años de finalizar el tratamiento fueron: control local de 93%, control locorregional del 89%, supervivencia libre de metástasis a distancia 85%, supervivencia libre de progresión 93% y supervivencia global 80% <sup>97</sup>. En cuanto a la toxicidad, describieron unas tasas de xerostomía al año de: 13,5% con grado 2, dos pacientes con grado 3 y ninguno con grado 4 <sup>97</sup>.

Debido a menor sobreirradiación de estructuras normales y mejor dosificación del volumen del tumor, la IMRT se ha convertido en el estándar de tratamiento de CNF, y es la "técnica de elección" de acuerdo con las directrices de la Red Nacional Integral del Cáncer.

#### 4.1.2. Quimioterapia

A principio de los años 90, se publicaron estudios con tasas de respuesta tras quimioterapia basada en cisplatino en pacientes con cáncer nasofaríngeo metastásico o recurrente locorregional <sup>98, 99, 100</sup>. Los resultados fueron: una respuesta completa del 20-25% aproximadamente y aumentó la supervivencia en 55%-75% de los pacientes.

#### Evidencia del efecto de la quimioterapia

Tras la demostración, *in vitro* <sup>101, 102, 103, 104</sup>, de una efecto sinérgico entre la radioterapia y la quimioterapia, se publicaron distintos estudio clínicos con tratamiento combinado en el carcinoma de nasofaringe.

En el ensayo en fase II RTOG (8117), se estudió la eficacia de la combinación de cisplatino (100 mg/m<sup>2</sup> administrado en bolo iv cada 3-4 semanas con un total de 3 ciclos) y radioterapia (1,8-2Gy/día durante 5 días a la semana con una dosis total de 73,8Gy en la localización del tumor primario) en pacientes con cáncer de cabeza y cuello en estadio III o IV <sup>105</sup>; los resultados de los pacientes con carcinoma nasofaríngeos, se basaron en 27 casos (26 de ellos estadio IV), con una mediana de seguimiento de 17,5 meses y un rango de 1 y 95 meses. Se observó una respuesta completa al tratamiento en 24 de los 27

(89%), 4 de los 24 pacientes padecieron algún tipo de toxicidad con grado 3 o 4<sup>106</sup>. Posteriormente, un ensayo fase III comparó también la terapia combinada demostrando su superioridad, con una tasa de supervivencia libre de enfermedad a los 3 años del 69% frente al 24%, siendo estos resultados significativos ( $p < 0,001$ ) y la tasa de supervivencia a los 3 años fue de 78% frente a 47%, siendo también significativo ( $p 0,005$ )<sup>106</sup>.

A raíz de estos resultados, el tratamiento con radioquimioterapia es considerado como estándar en la práctica clínica.

#### 4.1.3. Cirugía

La anatomía de esta región condiciona una gran complejidad y limitaciones técnicas, incluso en tumores iniciales, por lo que la cirugía del tumor primario es un tratamiento meramente anecdótico y se reserva para la extirpación de las adenopatías cervicales con persistencia o recidiva de la enfermedad tras tratamiento oncológico.

## **4.2. Tratamiento del cáncer precoz de nasofaringe**

### **4.2.1. Radioterapia externa**

En la actualidad, la radioterapia externa se utiliza como tratamiento radical en etapas precoces, sobre todo en el estadio I.

En el estudio realizado en 2009 por Xiao en China, se evaluaron 362 pacientes con carcinoma de nasofaringe en estadios I y II, con un 75% de T2. La mayoría de estos pacientes fueron tratados con radioterapia externa radical mediante técnica 3D, el grupo histológico más común fue el carcinoma pobremente diferenciado. La supervivencia global a los 5 años fue del 85%, y el control local aproximadamente del 90%. Estas cifras fueron decreciendo a medida que aumentaba el T o el N. Así, se obtuvieron tasas de supervivencia del 96,6% para T1N0, 91,3% T2N0, 85,8%% T1N1 y 73,1% T2N1. Los pacientes T2N1 tuvieron un pronóstico peor que los demás estadios (T1-2N0 y T1N1), siendo las metástasis a distancia la manifestación más frecuente en los mismos. Alrededor del 20% de los pacientes T2N1 sufrió metástasis a distancia, mientras que la supervivencia libre de enfermedad fue del 95% para los otros grupos <sup>107</sup>.

Una serie similar de Hong Kong informó sobre los resultados obtenidos en 141 pacientes en estadios I y II tratados con radioterapia radical <sup>108, 109</sup>. En los pacientes con estadio I se consiguió una supervivencia específica a los 10 años del 98%, supervivencia libre de recurrencia del 94%, control local del 96%, y 2% de metástasis a distancia. Los resultados descendieron en pacientes en estadio II, con una supervivencia específica de la enfermedad del 60% y un 36% metástasis a distancia, aunque el control local fue bueno (93%). La

presencia de adenopatías (N1) fue más importante que la categoría T2, tal como se evidenció en la serie anteriormente mencionada <sup>107</sup>.

En los estudios donde se descomponen el estadio II en aquellos con o sin enfermedad parafaríngea, la mayoría mostraron esta progresión, lo que fue un hecho importante para la clasificación de AJCC que modificó la estadificación siendo la afectación parafaríngea la característica principal de T2.

#### 4.2.2 Cirugía

El tratamiento quirúrgico en el carcinoma de nasofaringe, no tiene un papel como tratamiento primario, por la complejidad de la anatomía de la nasofaringe que compromete habitualmente la resección completa de estas lesiones. Así su papel está dirigido a la persistencia o recurrencia locorregional.

### **4.3. Tratamiento del cáncer avanzado de nasofaringe**

#### **4.3.1. Radioquimioterapia concurrente**

Existen diferentes estudios en los que se basa la indicación actual de la radioquimioterapia concomitante.

#### **Intergrupo 099**

Este ensayo tenía como objetivo investigar si la radioquimioterapia concurrente seguida de quimioterapia adyuvante era superior a la radioterapia exclusiva en el cáncer avanzado de nasofaringe, incluyendo pacientes con estadio III- IV, sin evidencias de metástasis a distancia <sup>106</sup>. Los pacientes fueron tratados con técnicas de radioterapia con planificación 2D aplicada con una fuente de cobalto 60, dividiendo el ensayo en dos brazos, uno en que el tratamiento constaba de radioterapia y el otro donde recibían radioterapia y quimioterapia concomitante.

La dosis de radioterapia fue de 70 Gy con un fraccionamiento de 2 Gy al día sobre tumor primario y ganglios macroscópicamente afectados, y de 50 Gy con un fraccionamiento de 2 Gy al día sobre ganglios linfáticos cervicales potencialmente afectados con enfermedad microscópica <sup>106</sup>.

La quimioterapia concurrente utilizada fue cisplatino, con una dosis de 100 mg/m<sup>2</sup> en los días 1, 22, y 43 de la radioterapia. Finalmente, los pacientes recibieron quimioterapia adyuvante posterior con cisplatino a 80 mg/m<sup>2</sup> por vía intravenosa los días 71, 99, y 127 y 5-FU 1,000 mg/m<sup>2</sup>/d por 96 h de infusión en día 71-74, 99-102, y 127-130 <sup>106</sup>.



La supervivencia libre de progresión (SLP) y la supervivencia global (SVG) fueron los objetivos finales principales del estudio. El estudio fue planteado para un total de 270 pacientes, pero tras análisis internos provisionales del 56 y 78% de los respectivos brazos del ensayo, se suspendió el estudio porque los resultados eran claramente favorables para un brazo del ensayo <sup>106</sup>.

Se observó un incremento significativo de supervivencia global y libre de enfermedad a favor del brazo de quimiorradioterapia, con una tasa de SVG y SLP a 3 años del 78% vs 47% (p 0,005) y del 69% vs 24% respectivamente (p 0,001) <sup>106</sup>.

El Intergrupo 0099 se convirtió así en el primer estudio prospectivo aleatorizado que demostró una mejora en la adición de la quimioterapia concomitante y adyuvante a la radioterapia en comparación con la radioterapia sola. Con respecto a la toxicidad, se observó una incidencia significativamente mayor de leucopenia grado 3 o 4 y vómitos en pacientes tratados con quimioterapia (p <0,05). El 63% de los pacientes fue capaz de tolerar los tres cursos previstos de quimiorradioterapia concomitante, y el 55% toleró los tres cursos previstos de la quimioterapia adyuvante posterior <sup>106</sup>.

#### B. Otros ensayos posteriores: Radioterapia y quimioterapia concomitante

Tras el ensayo del Intergrupo 099, se realizaron numerosos trabajos que combinaban la radioterapia y la quimioterapia de manera concomitante con resultados a favor de este último esquema.

Wee et al, publicaron un ensayo comparando la radioterapia frente a la radioquimioterapia concomitante con posterior quimioterapia adyuvante. La radioterapia se realizó con técnica en 2D con el fraccionamiento convencional,

mientras que la quimioterapia consistió en cisplatino (25 mg/m<sup>2</sup> desde el día 1 a 4) en las semanas 1, 4 y 7 de la radioterapia, y posteriormente cisplatino adyuvante (20 mg/m<sup>2</sup> desde el día 1 al 4) y fluorouracilo (1000 mg/m<sup>2</sup> desde el día 1 al 4) cada 4 semanas (semanas 11, 15 y 19) realizándose tres ciclos después de la finalización <sup>110</sup>. El tiempo medio de seguimiento fue de 3,2 años y la SVG a los 2 y 3 años fue del 78% vs 85% y 65% vs 80% respectivamente, siendo mayor en el grupo de la terapia combinada y con significación estadística <sup>110</sup>.

El ensayo del Grupo del Carcinoma nasofaríngeo de Hong Kong (HK 99-01) <sup>111</sup> analizó en un estudio randomizado las diferencias entre radioterapia y quimiorradioterapia seguido de quimioterapia adyuvante, en 384 pacientes afectados de carcinoma nasofaríngeo reclutados entre marzo de 1999 enero de 2004, 176 tratados con radioterapia y 172 con quimiorradioterapia. Alrededor del 40% de los pacientes en ambos brazos recibió una dosis de sobreimpresión de 15Gy. Los pacientes fueron tratados con 2D y con 3D en un 50% de los casos. El 52% de los pacientes en el grupo de quimiorradioterapia recibió los tres ciclos de cisplatino concurrente y el 76% recibió los tres ciclos de quimioterapia adyuvante.

El grupo de quimiorradioterapia obtuvo una mayor supervivencia libre de enfermedad (72% vs. 62% a los 3 años, p 0,027), principalmente como resultado de una mejora en el control locorregional (92% vs. 82%, p 0,005). Sin embargo, el control a distancia no mejoró significativamente (76% vs. 73%, p 0,47), y las tasas de supervivencia global fueron casi idénticas (78% vs. 78%, p 0,97). Los pacientes en el grupo de quimiorradioterapia sufrieron toxicidades

más graves agudas (84% vs. 53%,  $p < 0,001$ ), y tardías (28% vs. 13%,  $p 0,024$ )

111.

Posteriormente, Lee et al, publicaron un estudio con 2500 pacientes consecutivos <sup>112</sup> tratados con radioterapia exclusiva en todos los centros públicos de oncología en Hong Kong durante el período 1996-2000 y se encontraron con una tasa de supervivencia global a los 3 años similar (74%) a la alcanzada en el brazo de radioterapia exclusiva del ensayo HK 99-01 (78%). El grupo llegó a la conclusión de que la diferencia en el resultado del HK 99-01, en comparación con los resultados de los ensayos del Intergrupo 099 y de Singapur, podría ser explicada por la mejora de la tecnología de la radiación, que podría haber difuminado el potencial beneficio de la quimioterapia

El Ensayo HK 99-02 <sup>113</sup> fue un estudio randomizado de cuatro brazos que comparaba el tratamiento con radioterapia exclusiva vs quimiorradioterapia En pacientes con estadios T3-4N0-1M0. La radioterapia exclusiva se realizó con técnicas 2D y 3D utilizando esquemas con fraccionamiento convencional de 5 sesiones a la semana vs fraccionamiento acelerado con 6 sesiones a la semana. Esto mismo se realizó en los esquemas con terapia combinada. Se incluyeron pacientes con estadios T3-4N0-1M0. El esquema de fraccionamiento acelerado de 6 fracciones por semana se basó en el Danish Head and Neck Cancer Study Group (DAHANCA) <sup>114</sup>. Tras incluir a 189 pacientes, el ensayo fue interrumpido antes de tiempo debido al lento reclutamiento de pacientes.

Tras un período medio de seguimiento de 2,9 años, se logró una mejora significativa en la supervivencia libre de enfermedad en el brazo de

radioquimioterapia con fraccionamiento acelerado en comparación con la radioterapia única con fraccionamiento convencional (94% vs. 70% a las 3 años,  $p = 0,008$ )<sup>113</sup>. Sin embargo, en los brazos de la radioterapia con fraccionamiento acelerado en monoterapia y la radioquimioterapia con fraccionamiento convencional no se objetivaron ninguna mejora en la supervivencia libre de enfermedad en comparación con el grupo de radiación exclusiva con fraccionamiento convencional. Por otra parte, la toxicidad tardía, fue significativamente mayor en el brazo de radioquimioterapia con fraccionamiento acelerado en comparación con la radioterapia en monoterapia con fraccionamiento convencional (34% vs. 14%,  $p = 0,05$ )<sup>113</sup>. La mayoría de las toxicidades fueron de grado 3 de gravedad y sólo el 2% en el grupo de tratamiento con quimiorradioterapia fraccionamiento acelerado fueron de grado 4<sup>113</sup>.

Por último, Chen y cols. evaluaron 279 pacientes afectados de carcinoma nasofaríngeo con histología de carcinoma no queratinizados que realizaron tratamiento con radioterapia con sobreimpresión en el espacio parafaríngeo<sup>115</sup>. El cisplatino se administró semanalmente en una dosis de 40 mg/m<sup>2</sup> durante 7 semanas junto con la radioterapia. La quimioterapia adyuvante consistió en una combinación de cisplatino (80 mg/m<sup>2</sup> por vía intravenosa) en el día 1 y el 5-FU (800 mg / m<sup>2</sup> por vía intravenosa) en los días 1-5 en infusión durante 120 h.

Con una mediana de seguimiento de 29 meses, las tasas de supervivencia global a 2 años, de supervivencia libre de enfermedad, de supervivencia libre de enfermedad a distancia, y de supervivencia libre de enfermedad locorregional para radioquimioterapia vs. radioterapia fueron significativamente mejor en la terapia combinada: 89,8% vs. 79,7% ( $p = 0,003$ ), el 84,6% frente al

72,5% (p 0,001), el 86,5% frente al 78,7% (p 0,024) y el 98,0% vs. 91,9% (p 0,007) <sup>115</sup>.

Aunque el grupo que recibió radioquimioterapia experimentó significativamente mayor toxicidad aguda (62,6% vs. 32%, p 0,000), la mayoría de los pacientes completaron la terapia; un total de 107 pacientes (68%) y 97 pacientes (61%) completaron todos los ciclos de quimioterapia concurrente y adyuvante, respectivamente <sup>115</sup>.

#### 4.3.2. Radioquimioterapia concurrente seguida de Quimioterapia adyuvante

A raíz del estudio del Intergrupo 099 <sup>106</sup>, la quimioterapia adyuvante se ha utilizado de forma rutinaria en el CNF con enfermedad locorregional avanzada en algunos centros asiáticos. Sin embargo, ninguno de los estudios de fase III publicados hasta la fecha ha demostrado un beneficio en supervivencia <sup>116, 117, 118</sup>. En un meta-análisis del grupo MAC-NPC, basado en los datos de 1.753 participantes pertenecientes a ocho ensayos clínicos, sus resultados no demostraron ningún beneficio en la supervivencia con quimioterapia adyuvante <sup>89</sup>.

#### 4.3.3. Quimioterapia de inducción seguida de Radioterapia +/- Quimioterapia

La quimioterapia neoadyuvante, con regímenes basados en platino, se ha utilizado en la práctica clínica para el tratamiento de tumores primarios voluminosos, donde la dosis de radiación adecuada significaba un riesgo significativo en las estructuras vitales, tales como el nervio óptico o del tronco cerebral <sup>119</sup>. De todos los estudios de fase III publicados hasta la fecha, ninguno ha informado un beneficio en la supervivencia de la quimioterapia neoadyuvante frente a la radioterapia aislada <sup>120, 121, 122, 123</sup>. Sin embargo, en un análisis combinado de dos estudios realizados en China <sup>121, 122</sup>, se informó de una absoluta mejoría del 12,9% en la supervivencia global a favor del grupo con quimioterapia neoadyuvante tras 5 años de seguimiento.

Recientemente se han evaluado regímenes neoadyuvantes basados en taxanos. En un estudio de fase II, la adición de dos ciclos de carboplatino y paclitaxel previamente a la radioterapia concomitante se toleró correctamente <sup>124, 125</sup>. Posteriormente, este esquema de inducción se ha comparado con radioquimioterapia con cisplatino semanal a baja dosis en un estudio aleatorizado con 60 pacientes <sup>125</sup>. La supervivencia global a los 3 años para los pacientes que recibieron quimioterapia de inducción con cisplatino y taxotere fue del 94,1%, en comparación con 67,7% para los que tenían radioquimioterapia concomitante (razón de riesgo de 0,24; intervalo de confianza del 95%, 0,078 a 0,73; p 0,012) <sup>125</sup>. Esta estrategia es prometedora y requiere una evaluación adicional en el contexto de un estudio bien alimentado de fase II.

#### 4.3.4. Radioterapia exc-lusiva

Esta opción terapéutica se utiliza fundamentalmente en tumores precoces. Los resultados obtenidos con radioquimioterapia han mermado las indicaciones de radioterapia exclusiva en el cáncer localmente avanzado.

En la década de los 80s, después de la radioterapia radical, los pacientes afectos de carcinoma de nasofaringe en estadio III o IV tenían una incidencia entorno al 50% - 80% de recidiva local<sup>83, 84, 85, 86, 87, 88</sup> y un riesgo relativamente alto (aproximadamente 30%) de diseminación a distancia de la enfermedad.

En la actualidad, esta opción se reserva para pacientes que por su estado basal, no son subsidiarios de recibir quimioterapia. Consiste en una radioterapia radical de las mismas características que la que se aplica en estadios tumorales precoces.

#### 4.4. Tratamiento de la enfermedad recurrente

Aunque la radioquimioterapia ha mejorado el pronóstico del carcinoma nasofaríngeo, la tasa de recurrencias sigue siendo un problema, presentándose en el 20% de los pacientes tratados<sup>126</sup>. Las modalidades terapéuticas se agotan generalmente en el tratamiento primario, siendo difícil la elección terapéutica en los pacientes con cáncer nasofaríngeo que experimentan recurrencias locales y/o regionales.

La cirugía juega un papel relativamente reducido en el tratamiento inicial del cáncer de la nasofaringe, sin embargo es una opción de tratamiento importante para los pacientes que experimentan recidiva después de la radioterapia o

radioquimioterapia. Las recidivas aisladas en el cuello sin evidencia de metástasis a distancia o la recurrencia local en la nasofaringe se pueden manejar con éxito con la cirugía. En caso de recidiva local en nasofaringe o periferia, el tratamiento de rescate usando reirradiación es una opción válida. No obstante, como en la mayoría de los pacientes con CNF recurrente tratados previamente con dosis de irradiación con intención radical, la irradiación puede provocar una alta incidencia de complicaciones significativas.

Se han introducido medidas terapéuticas alternativas en el tratamiento de la enfermedad recurrente en la nasofaringe, como son la braquiterapia o la resección quirúrgica. Estas alternativas son aplicables especialmente cuando el tumor residual o recurrente es de tamaño reducido y está localizado en nasofaringe.

El objetivo de este apartado es abordar los procedimientos de tratamiento para la enfermedad locorregional recurrente o persistente en el CNF.

#### 4.4.1. Radioterapia externa

La reirradiación con intención curativa está a menudo limitada debido a la gran cantidad de estructuras importantes situadas en la proximidad que ya se irradiaron a dosis altas durante el tratamiento primario.

El objetivo de la reirradiación es conseguir una dosis alta en el volumen tumoral con una dosis mínima en los tejidos adyacentes críticos. Esto es a menudo difícil de lograr para estadios avanzados y en tumores voluminosos, incluso con el uso de IMRT y la quimioterapia de inducción.



Dependiendo del caso, existe la posibilidad de utilizar radioterapia externa, braquiterapia o radioterapia estereotáxica como primera opción para reirradiación de la nasofaringe.

Las tasas de supervivencia a 5 años después de reirradiación con radioterapia externa 2D han mostrado subóptimos resultados, con un rango de 8% a 36%<sup>127, 128, 129</sup>. Además se han acompañado de una alta incidencia de complicaciones tardías, principalmente daños neurológicos y necrosis de los tejidos blandos.

Posteriormente, la radioterapia en 3D ha mostrado una tasa de control local a los 5 años del 71%, aunque la incidencia de toxicidades a los 5 años fue muy alta, el 100% de los pacientes desarrolló de al menos alguna toxicidad de grado 3 y el 49% toxicidad de grado 4<sup>130</sup>.

Por otro lado, Lu et al publicaron sus resultados con IMRT a alta dosis (68-70 Gy) en la reirradiación, mostrando una tasa de control del 100% en 49 pacientes sin complicaciones tardías graves después de una mediana de seguimiento de 9 meses<sup>131</sup>.

Chua et al publicaron un estudio donde se utilizó IMRT con dosis media de 54 Gy después del tratamiento inicial con radioterapia con o sin quimioterapia de inducción (los pacientes reclutados, siguieron distintos protocolos terapéuticos) y con una dosis sobreimpresión de radiocirugía, informó una tasa de control loco-regional al año del 56%, y una tasa de complicaciones tardías grado 3 del 25% en 31 pacientes con enfermedad no susceptible de cirugía o braquiterapia<sup>132</sup>. Se observó una tasa de control local a los 5 años del 43% para la enfermedad rT1-3 y el 27% para rT4. Las complicaciones tardías incluyeron

neuropatía craneal en el 32%, necrosis cerebral en 13%, necrosis de tejidos blandos y osteorradionecrosis en el 6% y pseudoaneurisma carotídeo en un 3%<sup>169</sup>.

#### 4.4.2. Radioterapia y quimioterapia combinadas

La aplicación de quimioterapia junto con radioterapia se ha utilizado en el tratamiento del CNF recurrente a nivel local.

Chua et al, realizaron un estudio donde se empleó quimioterapia de inducción con gemcitabina y cisplatino para reducir el tamaño del volumen tumoral seguido de reirradiación usando IMRT, informaron de una tasa de control local del 75% en 1 año<sup>133</sup>.

Posteriormente a este estudio, Chua et al, realizaron otra investigación donde aplicaron quimioterapia de inducción con tres ciclos de gemcitabina y cisplatino seguido de reirradiación utilizando IMRT concurrente con cetuximab semanal en 16 pacientes con recurrencias locales, observando una toxicidad del 7% de los pacientes que desarrollan erupciones en la piel grado 3 y el 13% desarrolló mucositis grado 3. La tasa de control local a los 2 años fue del 47% y la tasa de supervivencia a 2 años fue del 71%<sup>134</sup>.

También se ha utilizado en el tratamiento de enfermedad local recurrente la quimiorradioterapia concomitante con cisplatino seguido de una terapia de consolidación con cisplatino y 5-FU. Los resultados fueron una tasa libre de enfermedad en 1 año del 42%<sup>135</sup>.

#### 4.4.3. Braquiterapia

La braquiterapia es una modalidad de radioterapéutica donde isótopos radiactivos se colocan dentro o cerca de la zona que requiere tratamiento.

En el tratamiento de la enfermedad local recurrente del carcinoma nasofaríngeo se ha utilizado dos tipos de braquiterapia: endocavitaria e intersticial.

La braquiterapia intracavitaria consiste en la colocación de la fuente de radiación en un espacio junto al tejido diana. Law et al, realizaron tratamiento con braquiterapia intracavitaria en 128 pacientes con enfermedad recurrente local, obteniendo los siguientes resultados: tasa total de remisión completa del 97%, tasas de control local a 5 años 85%, supervivencia libre de recaídas 68,3%, supervivencia específica de la enfermedad 74,8%, supervivencia general 61,3% y complicaciones mayores 46,9%, siendo estas: cefaleas por necrosis nasofaríngea, necrosis de las vértebras cervicales con inestabilidad atlantoaxial, necrosis del lóbulo temporal y parálisis de los nervios craneales

136

En la braquiterapia intersticial las fuentes se colocan directamente en el tejido diana de la zona afectada. Así se desarrollaron granos de oro radiactivos ( $^{198}\text{Au}$ ) colocados directamente en el tumor vía transnasal con ayuda de un endoscopio o a través de una apertura en el paladar. Para los tumores localizados en la nasofaringe, y sin invasión ósea, este método ha proporcionado un alto porcentaje de éxito con mínima morbilidad. El procedimiento quirúrgico es simple, se realiza una incisión sobre el paladar blando que se divide en la línea media y, junto con el mucoperiostio por encima del paladar duro, se retrae lateralmente. Choy et al, publicaron una serie donde

utilizaron esta técnica encontrando que el 10% de los pacientes desarrollaban una pequeña fístula palatina que se controlada con medidas conservadoras (prótesis palatinas) o reparadas quirúrgicamente <sup>137</sup>.

Kowng et al, utilizaron implantes de grano de oro para el tratamiento de tumores residuales y recurrentes después de la radioterapia externa inicial, se reportaron tasas de control local del tumor a 5 años de 87% y 63%, respectivamente, y tasas de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años del 68% y 60% <sup>138</sup>.

#### 4.4.4. Radioterapia esterotáxica

La radiocirugía esterotáxica consiste en aplicar una única dosis ablativa de radiación para destruir el tejido tumoral. Esta técnica ha sido aplicada como dosis de sobreimpresión en la enfermedad primaria y en la enfermedad recurrente del CNF.

Según los datos recogidos en la literatura, cuando la radiocirugía esterotáxica se utilizó sobre le enfermedad recurrente local administrando una dosis de 12 a 24 Gy en el tumor, se produjo una tasa de control local a los 3 años del 50 - 67% <sup>139, 140, 141, 142, 143</sup>. Esto dio origen al uso de la radioterapia esterotáxica que consistía en la misma técnica pero aplicando varias fracciones de tratamiento con menor dosis.

La radioterapia esterotáxica parece ser superior a la radiocirugía, mostrando una tasa de control local 3 años de 75% <sup>144</sup>. En base a estos resultados, existe

una fuerte evidencia que indica que la radioterapia esterotáxica es un tratamiento eficaz en recidivas o persistencias locales.

Aunque la mayoría de series objetivaron un riesgo relativamente bajo de complicaciones tardías después de este tratamiento, la complicación más grave fue la hemorragia masiva resultante de pseudoaneurisma carotídeo <sup>145</sup>, generalmente debido al uso de grandes dosis en las fracciones y alta dosis acumulativa.

#### 4.4.5. Cirugía:

Dentro de la cirugía de la enfermedad recurrente se distingue la cirugía dirigida a la enfermedad local y a la enfermedad regional.

##### A. Cirugía de rescate a nivel de la nasofaringe: Nasofaringectomía

Cuando el tumor residual o recurrente en la nasofaringe es de un tamaño demasiado grande para que la aplicación de braquiterapia sea resolutive, o si el tumor se ha extendido al espacio paranasofaríngeo, la opción de rescate más recomendable es la cirugía. La nasofaringectomía que consiste en la extirpación de la mucosa de la nasofaringe y la trompa de Eustaquio, es eficaz en la erradicación de la enfermedad localizada en pacientes seleccionados.

La nasofaringe se sitúa en el centro de la cabeza; a una distancia de más de 10 cm de la superficie de la piel en todas las direcciones. Es complejo exponer la región adecuadamente para permitir una resección oncológica, especialmente para tumores que se extienden a regiones vecinas. La resección de CNF residual o recurrente con cirugía endoscópica es teóricamente posible

<sup>146</sup>. Este enfoque es aplicable para pequeñas lesiones localizadas en la parte central de la pared posterior o en la pared superior, pero sin invasión hacia a la fosa de Rosenmüller. Sin embargo, la mayor parte de los CNF residuales o recurrentes afecta a la pared lateral de la nasofaringe, lo que limita la aplicación de este abordaje quirúrgico mínimamente invasivo.

A través de los años, se han utilizado numerosas vías para exponer la nasofaringe de manera que pueda realizarse una nasofaringectomía adecuada para los tumores más voluminosos o aquellos que se han extendido al espacio paranasofaríngeo.

El cerebro y la médula espinal descartan las vías de acceso superior y posterior. Las vías transantral y el degloving del tercio medio facial son accesos desde la parte anterior, pero que no exponen la pared lateral de la nasofaringe. Estos abordajes anteriores, incluso con la fractura del paladar duro, sólo exponen la parte central de la nasofaringe incluyendo las paredes superior y posterior, pero no la zona posterolateral del espacio paranasofaríngeo. Fish describió una técnica para visualizar la nasofaringe desde la cara lateral, a través de la fosa infratemporal, hace más de dos décadas <sup>147</sup>. Esta vía de entrada comienza con una mastoidectomía radical movilizandando diversas estructuras, que incluyen la arteria carótida interna, pares craneales y el suelo de la fosa craneal media. Con todo esto se expone principalmente la pared lateral de la nasofaringe en el lado de la cirugía, pero es difícil eliminar la lesión que se ha extendido a través de la línea media hacia el lado contralateral. Este procedimiento es técnicamente exigente, el tiempo quirúrgico muy prolongado y las morbilidades resultantes no son insignificantes.

Los nasofaringe también se pueden abordar desde la cara inferior empleando vías transpalatina, transmaxilar, infratemporal y transcervical <sup>148, 149</sup>. Estas técnicas son útiles para tumores localizados en la parte central de la nasofaringe.

Para tumores más extensos, especialmente para aquellos que involucran la pared lateral, la disección del espacio paranasofaríngeo es difícil desde vías de abordaje inferiores. Durante la disección, la arteria carótida interna tiene que ser protegida, y no es fácil de controlar el margen superolateral del tumor desde abajo.

El abordaje anterolateral de la nasofaringe o el procedimiento de oscilación del maxilar, también se ha empleado con éxito para realizar una nasofaringectomía durante casi dos décadas desde su primera descripción en 1991 <sup>150</sup>. Mediante una rinotomía paralateronasal de descargas de Weber-Ferguson, se realizan diferentes osteotomías: en la pared anterior del maxilar, paladar duro, y entre la tuberosidad del maxilar y las placas pterigoideas; el antro maxilar junto con el paladar duro forma un complejo osteocutáneo pediculado mediante los tejidos blandos de la región de la mejilla que se desplaza lateralmente, exponiendo toda la nasofaringe y el espacio paranasofaríngeo, para permitir una resección quirúrgica oncológica adecuada. Se puede extirpar toda la nasofaringe junto con la trompa de Eustaquio en el lado de la oscilación con el tumor en bloque. Con la resección de la parte posterior del tabique nasal, se puede exponer el tumor cuando está extendido más allá de línea media hasta eliminar de manera adecuada el borde medial de la trompa de Eustaquio contralateral. Después de que el maxilar se gire lateralmente, la disección de del espacio paranasofaríngeo puede realizarse bajo visión directa. Se puede palpar y

proteger la arteria carótida interna fuera de la fascia faringobasilar durante la disección.

Las mortalidades asociadas con estos procedimientos de cirugía de rescate han sido generalmente bajas y aceptables. Como estos pacientes han sido sometidos previamente a la radioterapia radical, la completa cicatrización será prolongada. Una de las complicaciones iniciales asociada a la oscilación maxilar fue el desarrollo de una fístula palatina <sup>151</sup>. Estos pacientes tienen que usar una placa palatina para la deglución y el habla.

Recientemente, se han diseñado otras osteotomías que reducen el índice de fistulas palatinas <sup>152</sup>. Algunos pacientes desarrollaban trismus después de la nasofaringectomía con el abordaje anterolateral, relacionado con la fibrosis del músculo pterigoideo tras la radioterapia y la cirugía. Esto, en general, respondió a estiramiento pasivo y no afectó significativamente la calidad de vida de estos pacientes que se habían sometido a esta cirugía <sup>153</sup>. En general, siempre y cuando el tumor persistente o recurrente puede ser resecado con un margen claro, los resultados a largo plazo han sido satisfactorios. El control a los 5 años de los tumores en la nasofaringe con esta cirugía de rescate se ha informado alrededor del 65% y la tasa de supervivencia libre de enfermedad a los 5 años es de alrededor de 54% según los datos recogidos por Wei et al <sup>154</sup>.

En un estudio similar realizado en España los resultados de control tumoral a los 3 años fue del 42%, mientras que la supervivencia libre de enfermedad a los 2 y 5 años fueron del 53 y 42%, respectivamente <sup>155</sup>.



### B. Cirugía de rescate a nivel cervical: Vaciamientos ganglionares

Cuando el único sitio con enfermedad maligna es el cuello, después de la terapia inicial, debe instaurarse tratamiento para erradicar la enfermedad. La eficacia de la quimioterapia para el tratamiento de rescate de la enfermedad regional es muy baja y la reirradiación ha mostrado una supervivencia a los 5 años de 19,7% <sup>156</sup>. La irradiación también se asocia con efectos secundarios significativos.

La resección quirúrgica de la recurrencia o persistencia cervical se convierte en la mejor opción.

La disección ganglionar del cuello puede ser selectiva (eliminación de las adenopatías linfáticas de niveles II, III y Va), funcional (eliminación de todos los ganglios linfáticos en el cuello y preservación de las estructuras no linfáticas como el nervio espinal, la vena yugular interna y el músculo esternocleidomastoideo) o radical (eliminación de todos los ganglios linfáticos en el cuello, junto con todas las estructuras no linfáticas mencionadas). La extensión de la resección quirúrgica depende de las características patológicas de los ganglios y de su localización.

El procedimiento de rescate quirúrgico que se realiza con mayor frecuencia para la enfermedad cervical persistente o recurrente es el vaciamiento ganglionar cervical radical, puesto que los cambios postratamiento dificultan la disección funcional en la mayoría de los casos. El control cervical a los 5 años es del 66% y la supervivencia a los 5 años para estos pacientes es de 37% <sup>157</sup>.

Para evitar complicaciones quirúrgicas, la incisión cervical de Macfee es la más aconsejable. Esta consiste en dos incisiones paralelas con una separación

de al menos 7 cm que dejen el platismo en el colgajo de la piel. Esta incisión proporciona una circulación adecuada y evita la necrosis en el borde de las incisiones <sup>158</sup>.

### Estudio histológico del vaciamiento ganglionar

En 1992, Wei y col. analizaron la anatomía patológica en 43 vaciamientos cervicales radicales en pacientes con enfermedad residual cervical tras realizar tratamiento <sup>159</sup>. En más del 70% de la muestra estudiada, aparecieron más adenopatías patológicas de las detectadas en la exploración clínica o mediante estudios de imagen. La distribución de los ganglios linfáticos fue a lo largo los cinco niveles en el cuello, aunque la mayoría de ellos estaban ubicados en los niveles II y Va. Entre los ganglios linfáticos que albergaban las células malignas, el 60% no presentó extensión extracapsular. En 35% de las muestras, las células de carcinoma infiltraban estructuras no linfáticas del cuello. En el 28% de las muestras, se observaron células malignas infiltrando la proximidad del nervio espinal accesorio. Cuando se realiza una disección menos extensa en un procedimiento de rescate, hay riesgo de persistencia enfermedad y de que la disección sea un fracaso.

### Ampliación del vaciamiento cervical radical

A veces, la enfermedad recurrente o residual puede ser extensa, situada cerca o infiltrar la piel que recubre el músculo esternocleidomastoideo o la región del triángulo posterior. En ocasiones, las adenopatías patológicas están adheridas a estructuras vitales susceptibles de resección pero sin seguridad de que se elimine por completo la enfermedad microscópica. En estos casos hay que emplear otras medidas terapéuticas adyuvantes para asegurar un margen

tumoral. Puesto que ya la zona cervical ha sido irradiada, una reirradiación conlleva muchas complicaciones respecto a la toxicidad.

La braquiterapia en el lecho quirúrgico es una opción posible, dejando unos tubos de nylon huecos sobre el lecho quirúrgico. La piel que cubre la fuente de braquiterapia se irradió durante el tratamiento inicial, y tiene riesgo de necrosis ya que también recibirá radiación adicional de la braquiterapia. En el caso de quedar un defecto cutáneo, debe ser reconstruido con la piel no irradiada a través de un colgajo de pectoral mayor, deltopectoral, etc. La braquiterapia podría comenzarse el séptimo u octavo día postoperatorio, cuando la herida cervical ha sanado y los tubos de nylon podrían ser retirados después de la finalización de la braquiterapia.

Cuando esta terapia adyuvante se administra en pacientes con enfermedad cervical residual después de una disección radical, la tasa de control del tumor local es similar a la que se obtiene cuando la disección radical del cuello es menos extensa (control regional a los 5 años del 60% aproximadamente)<sup>160</sup>.

## **4.5. Desarrollo clínico de la terapia dirigida en el carcinoma nasofaríngeo**

### **4.5.1. Alteraciones moleculares en el carcinoma nasofaríngeo**

Los avances en la comprensión de la patogénesis molecular del CNF han conducido a la identificación de muchas aberraciones genéticas y epigenéticas que son comunes en este tumor. Estudios utilizando microarrays de expresión génica han revelado una alta frecuencia de la expresión aberrante de genes que controlan la apoptosis, la progresión del ciclo celular, la migración celular y la adhesión, crecimiento y diferenciación <sup>161</sup>. Oncogenes como BCL2, CCND1, MDM2, MYC, H-ras, N-ras, RAF1, EGFR, y PIK3CA están amplificados con frecuencia en los tejidos y/o en las líneas celulares del CNF <sup>162, 163</sup>.

La inactivación de los genes supresores de tumores es particularmente frecuente en el CNF, con deleciones cromosómicas que ocurren entre el 85 y el 95% de las regiones que implican 9p21 y 3p <sup>164</sup>. Estas regiones contienen genes supresores de tumores tales como p16 <sup>165</sup>, p15 <sup>166</sup>, p14ARF <sup>166</sup> y RASSF1A <sup>167</sup>, que se inactivan por medio de mecanismos que incluyen la metilación del promotor, mutación o eliminación. La infección latente del VEB y el silenciamiento epigenético de genes VEB inmunodominantes también pueden contribuir a la evasión de la inmunología del huésped frente al virus, mientras que el virus produce proteínas oncogénicas (por ejemplo, la proteína latente de membrana 1, LMP-1) participando a la carcinogénesis <sup>96, 164, 168</sup>.

#### 4.5.2. Factor de crecimiento epidérmico: Señalización mediada por receptores

Los inhibidores del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) fueron los primeros fármacos de terapia dirigida utilizados en la clínica en el CNF recurrente y metastásico. Esto se basó en la observación de que el gen EGFR se amplifica en el 40% <sup>169</sup> y la sobreexpresión de la proteína EGFR en más del 80% de estos tumores. La sobreexpresión de EGFR también se asocia con una menor supervivencia en pacientes con enfermedad locoregional avanzada tratados con radioquimioterapia <sup>170</sup>. En las células del CNF, el anticuerpo anti-EGFR monoclonal, cetuximab <sup>171</sup>, y el inhibidor de tirosina quinasa de EGFR, gefitinib <sup>172</sup>, han demostrado inhibir el crecimiento celular, inducir la apoptosis y ejercer un efecto aditivo cuando se combina con cisplatino. En base a estos datos, los investigadores del Hospital Príncipe de Gales realizaron un estudio multicéntrico fase II en 60 pacientes con CNF metastásicos tratados con regímenes basados en el platino sin respuesta, utilizando cetuximab y carboplatino <sup>173</sup>. Registraron 7 respuestas parciales con una tasa de respuesta global del 11,7%, y la tasa de estabilización de la enfermedad fue de 48,3%. En esta cohorte, donde más del 30% de los pacientes habían recibido tres o más líneas de tratamiento previo, la mediana del tiempo hasta la progresión y la supervivencia global fue de 2,6 y 7,7 meses, respectivamente. El tratamiento fue bien tolerado, y en cuanto a la toxicidad del cetuximab se observó exantema con grado 3-4 en el 12% de los pacientes.

Otro inhibidor de EGFR, gefitinib, se evaluó en un estudio de fase II en una dosis de 500 mg al día en pacientes refractarios a la quimioterapia en el Hospital Príncipe de Gales <sup>174</sup>. En cuanto a los resultados, 3 pacientes experimentaron estabilización de la enfermedad durante 8 meses, y el estudio

se terminó después de que 15 pacientes presentaran falta de respuesta. Esto es, probablemente, debido a la ausencia de la activación de mutaciones de la tirosina quinasa de EGFR en el CNF <sup>175</sup>.

#### 4.5.3. Angiogénesis tumoral

El factor inducible con la hipoxia 1a (HIF-1a) es un factor de transcripción que se activa en situaciones de hipoxia celular y su sobreexpresión produce mediadores importantes de la angiogénesis, como el factor de crecimiento endotelial vascular, sus ligandos y mediadores del metabolismo de la glucosa, como anhidrasa carbónica 9 (CA-9). El análisis de la expresión de las líneas celulares del CNF ha demostrado que la expresión de los genes que codifican HIF-1a, CA-9, VEGF y otras proteínas de señalización se aumentan bajo condiciones de hipoxia <sup>176</sup>. HIF-1a, CA-9 y VEGF también se sobreexpresa en más del 50% de estos tumores, estos factores predicen una supervivencia más corta después de la radioterapia en pacientes con enfermedad locorregional avanzada <sup>177</sup>.

Por lo tanto, la inhibición farmacológica de los mediadores de señalización de HIF-1a puede ser útil contra este carcinoma. Los investigadores han evaluado la actividad clínica de varios inhibidores de VEGF (por ejemplo, bevacizumab) o de sus receptores (VEGFR-2 y -3), tales como sorafenib, sunitinib, y pazopanib en pacientes afectados de carcinoma de nasofaringe.

La publicación de un estudio de fase II de sorafenib (400 mg) en pacientes refractarios a la quimioterapia, en carcinomas de nasofaringe con enfermedad avanzada y otros tumores de cabeza y cuello <sup>178</sup>, mostró que 6 de los 27 que

tenía CNF no respondieron al tratamiento, y el estudio finalizó después de la primera etapa. Los estudios de fase II de sunitinib y pazopanib como agente único en pacientes previamente tratados con CNF avanzado no han podido terminarse por complicaciones graves como hemorragias mortales hasta en un 64% de los pacientes reclutados <sup>179</sup>.

El anticuerpo anti-VEGF, bevacizumab, ha sido evaluado en pacientes con CNF avanzado (III-IVb) en combinación con IMRT y cisplatino (3 ciclos junto con bevacizumab) concomitante, con otros 3 ciclos posteriores de cisplatino y bevacizumab <sup>180</sup>. En este estudio se valoraron 44 pacientes, de los cuales ninguno sufrió hemorragias del grado 4-5, pero un 20% tuvo una toxicidad hemorrágica de grado 1-2, otro 20% una toxicidad hematológica grado 3-4 y un paciente sufrió una sepsis grado 4 en 2 ocasiones por neutropenia severa. En cuanto al control de la enfermedad, con una mediana de seguimiento de 2,5 años, el intervalo libre de progresión locorregional a los 2 años fue estimado en un 83,7% (IC del 95%: 72,6-94,9), el intervalo libre de metástasis a distancia fue de 90,8% (82,2-99,5), la supervivencia libre de progresión 74,7% (61,8-87,6), y la supervivencia global fue de 90,9% (82,3-99,4) <sup>180</sup>.

El uso de agentes anti-angiogénesis está asociada con un aumento de la tendencia a la hemorragia. Por lo tanto, estos agentes deben evitarse en pacientes con tumores localmente avanzados que invadan los vasos sanguíneos o plexo venoso, y en los que presentan epistaxis, aunque cada vez se están obteniendo mejores resultado como se menciona en el párrafo anterior.

#### 4.5.4. La modulación epigenética

El VEB existe en un estado de latencia en las células indiferenciadas del CNF en el que evade la respuesta inmune del huésped mediante la expresión de un repertorio limitado de genes latentes siendo silenciados los genes líticos. El silenciamiento epigenético de genes a través de la metilación del promotor es uno de los mecanismos clave en la expresión, así como en la regulación de genes supresores de tumores del huésped<sup>166, 181</sup>. Se ha postulado que la reversión farmacológica de la metilación del promotor puede dar lugar a la reexpresión de los antígenos silenciados del virus, que atrae a la respuesta inmune del huésped. Los investigadores de la Universidad China de Hong Kong y la Universidad Johns Hopkins (Singapur) fueron capaces de demostrar por primera vez en humanos que el agente de desmetilación, azacitidina, podría inducir la expresión de genes silenciados en los tejidos tumorales<sup>182</sup>. En este estudio, los pacientes con CNF recurrente y linfoma asociado al VEB que habían agotado todas las opciones de tratamiento, recibieron este fármaco comparándose posteriormente biopsias tumorales antes y después del tratamiento con azacitidina. El tratamiento fue bien tolerado por los 8 pacientes con CNF, y la expresión de la proteína reguladora viral, Ztd, se re-expresó en la biopsia post-tratamiento de un paciente. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación genómica mostró en las biopsias postratamiento de 4 pacientes la desmetilación parcial en el Cp y promotor Wp del genoma del VEB<sup>182</sup>. Un estudio de fase I de la combinación de la azacitidina y un inhibidor de la histona deacetilasa en el CNF que está en curso ha demostrado la desmetilación en las biopsias después del tratamiento<sup>183</sup>.



Además la metilación de estos promotores parece estar asociada a una resistencia a los taxanos que puede ser revertida con el uso de agentes desmetiladores <sup>184</sup>.

## **5. FACTORES PRONÓSTICOS BIOLÓGICOS**

Entre los datos que nos permiten predecir la evolución del carcinoma de nasofaringe se encuentran, como en el resto de localizaciones, una serie de factores que pueden estar relacionados con el paciente, la neoplasia o el tratamiento al que se somete.

Clásicamente, la estadificación clínica y la histología del tumor, así como el estado físico del paciente, se consideran los principales factores pronósticos de este tumor. Estos son factores bien conocidos que aportan una información precisa sobre la historia natural de la enfermedad, sin embargo neoplasias con el mismo tipo histológico e idéntico TNM pueden presentar evoluciones diferentes debido a las distintas características biológicas de las células tumorales. Por lo tanto, las características morfológicas de los tumores no pueden explicar el diferente comportamiento, así como la respuesta al tratamiento, en pacientes con el mismo estadio. Surge entonces la necesidad de encontrar nuevos indicadores de progresión tumoral que nos ayuden a comprender el porqué de una mayor o menor supervivencia y las posibilidades de recaída de la enfermedad para, en definitiva, elegir un tratamiento individualizado.

Así, en los últimos años se está intentando identificar factores biológicos para predecir la evolución del tumor y planificar nuevas estrategias terapéuticas que mejoren la supervivencia. De este modo, son muchos los factores pronósticos biológicos estudiados en el CNF, entre los que se encuentran el índice de proliferación celular, la ploidia de DNA y la expresión de proteínas y oncogenes. A continuación mencionaremos los más destacados en el CNF.

### **5.1. Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico**

El receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) forma parte de la familia de receptores tirosina quinasa (RTK).

Los cuatro receptores de la familia EGFR tienen estructuras físicas similares. HER-1 / EGFR es una proteína de 170 kDa que tiene un dominio de unión a ligando extracelular, un dominio transmembrana hidrofóbico, y dominio citoplásmico intracelular <sup>185</sup>. Es el miembro más alterado en neoplasias malignas de cabeza y cuello. El EGFR existe en células normales y su señalización es crucial para la supervivencia, el desarrollo y la homeostasis de estas células <sup>186</sup>. El EGFR también juega un papel importante en el desarrollo, progresión y metástasización de varias neoplasias. Aproximadamente el 70-100% de los carcinomas escamosos de cabeza y cuello sobreexpresan EGFR; este porcentaje también se mantiene en CNF <sup>187, 188, 189</sup>.

Los mecanismos implicados en la sobreexpresión de EGFR en células cancerígenas no se conocen completamente, pero pueden implicar amplificación de genes, factores de estrés microambientales y oncogenes virales <sup>190,191,192</sup>.

La hipoxia, es un fenómeno común durante la progresión de los tumores sólidos. Se ha demostrado que este fenómeno induce el factor de respuesta de crecimiento temprano 1 (Egr-1) que produce directamente la síntesis de EGFR, lo que confiere a las células cancerígenas la ventaja de crecimiento en condiciones de hipoxia <sup>191</sup>. A medida que el VEB ha sido reconocido como agente causante del CNF, se ha sugerido que la expresión de la proteína de membrana latente 1 (LMP1), que desempeña un papel importante en la génesis carcinoma, se asocia con una mayor expresión de EGFR <sup>193, 194, 195</sup>.

*EGFR en carcinoma nasofaríngeo*

Similar a otros carcinomas de cabeza y cuello, la sobreexpresión de EGFR en el CNF es bastante frecuente y se ha registrado hasta en un 80% en biopsias de tumores primarios <sup>187, 188, 189, 190, 196</sup>.

Del mismo modo, los estudios clínicos han demostrado que la sobreexpresión de EGFR es un factor pronóstico negativo para el CNF como para otros carcinomas de cabeza y cuello: La expresión de EGFR se ha demostrado que se correlaciona con la estadificación AJCC en pacientes con fase II-IV en el CNF, con mayor expresión en los tumores con estadios más avanzados <sup>189, 193</sup>.

La sobreexpresión de EGFR, también ha demostrado ser un factor pronóstico independiente de los resultados del tratamiento en pacientes con CNF con enfermedad locorregional avanzada. En un estudio prospectivo del Hospital Príncipe de Gales en Hong Kong con análisis multivariante, la fuerte expresión pretratamiento de EGFR mediante inmunohistoquímica (IHC) se asoció significativamente con menor supervivencia global y menor tiempo libre de enfermedad en 78 pacientes CNF tratados con radioterapia radical <sup>197</sup>. Estos hallazgos se confirmaron de manera similar en una serie más reciente <sup>188</sup>, los autores informaron sobre la asociación entre la expresión de EGFR y la supervivencia de la enfermedad específica, supervivencia libre de recaída, supervivencia libre de recaída locorregional, y las tasas libres de metástasis a distancia en 54 pacientes con estadio III-IV tratados con quimioterapia de inducción y radioterapia: los valores para dichos parámetros fueron, en el grupo con EGFR > 25% fueron 48%, 36%, 60% y 55%, mientras que el grupo con expresión EGFR < 25%, 86%, 80%, 93% y 86%. En el análisis multivariante, el

EGFR fue el único factor independiente que predice la recaída de la enfermedad, el fracaso locorregional, y la muerte por cáncer en esta serie<sup>188</sup>.

## **5.2. Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)**

### Angiogénesis

La angiogénesis es el proceso de desarrollo y formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una red vascular existente para soportar el crecimiento del tejido. Se trata de un fenómeno fisiológico importante en la fase embrionaria de desarrollo humano. Sin embargo, se suprime normalmente en la edad adulta y es un evento fisiológico raro en esta etapa de la vida<sup>198, 199</sup>.

El proceso de angiogénesis implica la degradación de las membranas basales, la migración y proliferación de células endoteliales, la formación del lumen, y la estabilización de neovasos, que son cruciales para el desarrollo, la invasión y la metástasis de tumor. Se ha demostrado que sin neovasos, el transporte de oxígeno y nutrientes es en gran parte a través de la difusión y el crecimiento de tumores sólidos estarían limitado a 2-3 mm de diámetro<sup>198, 200, 201, 202</sup>.

La angiogénesis se controla por factores pro y antiangiogénicos para las células endoteliales. Sin embargo, la estrecha supresión de la angiogénesis está presente de manera fisiológica y ausente en los tejidos tumorales<sup>202</sup>. Cualquier paso desde la expresión de ligandos y receptores, el compromiso ligando-receptor, o la cascada de transducción de señal eferente puede estar aumentado en tumores. Como tal, no sólo el proceso de la angiogénesis está activo, las características de las células endoteliales tumorales y estructuras perivasculares son sustancialmente diferentes de sus homólogos normales.

*La angiogénesis en el cáncer de la nasofaringe*

La angiogénesis juega un papel importante en el desarrollo, la progresión, así como aparición de metástasis en carcinomas de cabeza y cuello incluyendo CNF. VEGF y su receptor VEGFR2 se expresan en cerca de 90% de los carcinomas de cabeza y cuello, y aproximadamente en dos tercios de todos los CNF<sup>189, 199</sup>. La sobreexpresión de VEGF-A se asocia con un mal pronóstico en el cáncer de cabeza y cuello. Un meta-análisis de 12 estudios y 1002 pacientes con carcinomas de cabeza y cuello (7% de los casos fueron CNF) reveló que la positividad de VEGF-A, mediante estudios de IHQ, se asoció con una tasa de mortalidad mayor, en concreto se duplicó a los 2 años después del tratamiento<sup>203</sup>. Sin embargo, el meta-análisis no demostró una asociación entre la positividad de VEGF y la metástasis cervicales en los carcinomas de cabeza y cuello, posiblemente debido a la heterogeneidad de la población de pacientes incluidos y la falta de evaluación directa de la expresión de VEGF-C, que desempeña un papel muy importante en linfagiogenesis y posiblemente en la diseminación ganglionar. En un estudio específico de CNF, Wakisaka et al. encontraron que la intensidad de VEGF mediante IHC se correlacionaba con el número de microvasos en el tejido tumoral y la diseminación linfática regional en 29 pacientes con CNF, lo que indica que la angiogénesis inducida por VEGF puede estar relacionado con la metástasis cervicales en esta enfermedad<sup>204</sup>. Un estudio diferente de 73 pacientes con CNF (49 con enfermedad locorregional y 24 con enfermedad metastásica) demostró un aumento significativo de la densidad de microvasos (MVD) y la expresión de VEGF en el tejido tumoral en comparación con mucosa nasofaríngea normal. Del mismo modo, tanto MVD y la expresión de VEGF fueron significativamente elevados

en la enfermedad metastásica cuando se compara con enfermedad no metastásica <sup>205</sup>. En el estudio mencionado anteriormente por Krishna et al <sup>199</sup>, una mayor expresión de VEGF en tumores con VEB positivo se asoció con una mayor tasa de recurrencia tumoral, afectación ganglionar regional, y una peor supervivencia.

Resultados similares fueron reportados en el estudio de Pan et al <sup>189</sup>. La intensidad de la expresión de VEGF se correlacionó la extensión del tumor mediante la estadificación TNM.

Curiosamente, en un intento de validar pequeños informes institucionales previos, el RTOG (Radiation Therapy Oncology Group) evaluó MVD en 123 pacientes con CNF tratados con radioterapia radical y no encontró ninguna asociación significativa entre los dos parámetros <sup>206</sup>. La diferencia en cualquiera de los parámetros de medición, ya sea en técnicas de tratamiento o tamaño de la muestra de pacientes puede dar cuenta de los diferentes resultados observados a partir de esto y los estudios anteriormente mencionados. Sería ideal un estudio prospectivo de gran tamaño utilizando muestras de un grupo tratado de forma homogénea para obtener resultados extrapolables.

El nivel de VEGF en suero como un indicador de la angiogénesis también se ha estudiado en los carcinomas de cabeza y cuello incluyendo CNF. En un estudio de 65 pacientes varones con dicho tumor, se encontró que la expresión del VEGF en suero se asociaba significativamente con la enfermedad metastásica, en comparación con los individuos sanos y pacientes con enfermedad no metastásica, aunque no se detectaron diferencias significativas en los niveles de VEGF entre las categorías T, N, ni con estadios clínicos de la enfermedad

no metastásica <sup>207</sup>. Sin embargo, la importancia de la concentración sérica de VEGF en la predicción del resultado incluida la supervivencia global, la supervivencia libre de enfermedad o progresión, y las tasas de control local/regional no han sido investigadas a fondo.

### **5.3. p53**

El gen p53 es un supresor de tumores que induce la detención del ciclo celular cuando se detecta un daño en el ADN. En la mayoría de los cánceres de cabeza y cuello, los niveles bajos de p53 se deben a mutaciones <sup>208, 209</sup>. Sin embargo, p53 no se sigue este patrón clásico en el CNF. En las células de este carcinoma los niveles de p53 están aumentados <sup>210</sup> acompañados también con altos niveles de LMP1 que se correlacionan con una mayor expresión de p53 <sup>91, 211</sup>.

Las mutaciones de p53 son relativamente raras en el CNF, por lo que la gran mayoría de p53 expresada es de tipo “salvaje” <sup>212</sup>. El p53 de tipo “salvaje” no induce apoptosis en CNF porque se inactiva a través de 2 mecanismos: la pérdida de p14 y el exceso de DN-p63. El p14 mantiene la estabilidad de p53 mediante la inhibición de su proteólisis <sup>213</sup>; en el CNF, los niveles de p14 están bajos por la hipermetilación del promotor 99 permitiendo de este modo la degradación de p53 de manera más eficiente. El p63 es en realidad un homólogo de p53 con secuencias de ADN similares a p53 <sup>214</sup>. Hay una versión mutada de p63 en el CNF, denominado DN-p63, que carece del dominio N-terminal de transactivación necesaria para activar la apoptosis <sup>215</sup>.

La isoforma DN-p63 se une a las secuencias de ADN p63 normal y p53, evitando así a p63 o p53 normal, esto produce un fallo para inducir la apoptosis debido



a la pérdida de la secuencia N-terminal. La razón de los altos niveles de p53 en el CNF no está clara. Los altos niveles de p53 normal, puede producir desarrollo del CNF porque las células tumorales con p53 normales son inmunes a la apoptosis inducida por JNK (c-Jun N-terminal kinases) inducida<sup>216</sup>. Alternativamente, el aumento de la p53 de tipo “salvaje” puede ser simplemente la respuesta natural a la infección por VEB<sup>217</sup>.

A la luz de esto, parece que la pérdida de p53 no es crítica para el desarrollo de este carcinoma, lo que sugiere que la inactivación de otros genes supresores de tumores forma parte de la carcinogénesis.

#### **5.4. p16**

La p16 es una proteína quinasa dependiente de ciclina (CKI) que suprime la actividad del ciclo celular y se inactiva con frecuencia en el cáncer<sup>218</sup>. La función normal de p16 es la de suprimir la ciclina dependiente de quinasa 4 (cdk4), una enzima que controla la transición G1/S, regulando negativamente la actividad de la ciclina D1. Por lo tanto, la pérdida de p16 produce una sobreexpresión de la ciclina D1 y aumento de la transición G1/S<sup>219</sup>.

Los cánceres de cabeza y cuello, incluyendo CNF, presentan bajos niveles de p16 con niveles altos pRb (proteína Retinoblastoma)<sup>220,268</sup>.

En los carcinomas escamosos de cabeza y cuello, el mecanismo más común de inactivación de p16 es la delección homocigota del gen seguido de la hipermetilación del gen<sup>222</sup>.

Del mismo modo, las líneas de celulares del CNF tienen niveles bajos de p16 secundario a la hipermetilación de la p16, pero esta alteración epigenética puede ser mediada por la formación de heterodímeros c-Jun / JunB inducidos

por LMP 1, que activan ADN metiltransferasa <sup>223</sup>. Además, LMP1 inactiva p16 mediante la inducción de la acumulación citoplásmica de E2F4 / 5 y Ets2, que son proteínas nucleares requeridas para la actividad de p16 normal. Ets2 es un factor de transcripción clave para la expresión de p16 y LMP1 produce su translocación desde el núcleo hasta el citoplasma <sup>224</sup>.

E2F4 / 5 son proteínas inducidas por p16, necesarias para la detención del ciclo celular en G1, y su localización nuclear es dependiente de la unión a pRb nuclear <sup>225</sup>. LMP1 induce la translocación de E2F4/5 desde el núcleo hacia el citoplasma, causando una disociación entre E2F4/5 y la proteína pRb. LMP1 promueve una mayor acumulación citoplasmática de Ets2 y E2F4/5 por mediación de su unión a una proteína de exportación nuclear llamada región de mantenimiento cromosómica 1 (CRM-1). En el CNF, alrededor de dos tercios de los niveles de p16 exhiben una baja regulación, lo que indica que p16 no es crítico para el desarrollo esta neoplasia. Los pacientes con este carcinoma y con bajos niveles de p16 tienen un pronóstico peor, porque está asociado con la disminución de la radiosensibilidad y mayores tasas de recurrencia tumoral <sup>226, 227</sup>. La razón de esto puede ser que la mayor radiosensibilidad en células es justo antes de la síntesis de ADN y la pérdida de p16 aumenta el número de células en fase S.

Hay algunos datos que sugieren que el pretratamiento de los pacientes con CNF con terapia génica de p16 antes de la radiación puede mejorar los resultados; el mecanismo supuesto es que mediante la normalización de los niveles de p16, el control del ciclo celular es más lento en la etapa G1/S y el número de células en G1 aumenta <sup>228</sup>.

### **5.5. Vía de señalización Wnt**

La vía de señalización de Wnt es esencial para el desarrollo normal; sin embargo, a menudo se activa de forma aberrante en el cáncer. Las proteínas de la familia Wnt se unen a receptores de superficie celular de la familia Frizzled (Fzd). En ausencia de una señal Wnt, el activador transcripcional b-catenina se degrada de forma activa por la acción de una proteína compleja conocida como la "caja de destrucción", cuyo andamiaje consiste en Axin y la proteína de la poliposis adenomatosa coli (APC). Estas proteínas facilitan la fosforilación de b-catenina por caseinkinase 1a (CK1a) y glucógeno sintasa quinasa 3b (GSK3b). B-catenina fosforilada es entonces ubiquitinada y destinada a la degradación proteosomal.

Como resultado de estos procesos, los niveles de b-catenina libres son bajos en condiciones normales. La unión de Wnt a los receptores Fzd en la membrana producen la disolución de la "caja de destrucción" debido a la reubicación de Axin a la membrana celular. Esto permite que la b-catenina se acumule y entre en el núcleo, donde interacciona con otros diversos factores de transcripción para activar genes diana de Wnt, incluyendo C-myc<sup>229</sup>. La b-catenina citoplasmática también se une a la E-cadherina en las células normales para mantener la adhesión celular; por lo tanto, la eliminación de tales b-catenina puede resultar en la pérdida de proceso de anclaje célula-célula<sup>230</sup>.

La señalización de Wnt anormal ha sido implicada en el desarrollo y progresión de varios tumores sólidos, incluyendo los carcinoma escamosos de cabeza y cuello, tumores de hígado, cánceres de pulmón y cánceres colorrectales<sup>229</sup>.

De manera similar, existen fuerte evidencia que sugieren que la vía Wnt también juega un papel importante en el desarrollo del CNF. Más del 90% de los carcinomas de nasofaringe muestran una mayor expresión de la proteína Wnt y aproximadamente el 75% muestran una disminución de la expresión del factor inhibidor de Wnt (WIF), un antagonista Wnt endógeno <sup>231,232</sup>. La expresión WIF también se ha resultado ser un silenciador de promotores por hipermetilación en varias líneas celulares del CNF <sup>233</sup>.

Un estudio de la expresión génica confirma la sobreexpresión de los receptores FZD7 y regulación a la baja de AXIN2 en los tumores del CNF <sup>161</sup>. Los niveles nucleares de b-catenina estaban incrementados en más del 90% de esta neoplasia maligna y las células tumorales mostraron aumento de la fosforilación de GSK3b <sup>234</sup>. También se han encontrado sobreexpresados elementos que desecadenan la cascada de b-catenina como son: IL-8 (factor altamente pro-angiogénicos) y C-myc <sup>235, 236</sup>.

En conjunto, estos datos sugieren que la vía de señalización Wnt es un contribuyente en el desarrollo del CNF y una nueva diana terapéutica para el CNF.

### **5.6. MicroARN en CNF**

Recientemente, los microARN (miARN) han surgido como una nueva clase de genes no codificante implicados en la regulación de la proliferación celular, la diferenciación y la viabilidad <sup>237,238</sup>. MiARN son ARN no codificantes de 22-24 nucleótidos que se procesan a partir de un transcrito primario o pri-miARN, que generalmente se encuentra en intrones u otras regiones no codificantes.

Los Pri-ARNs se escinden en el núcleo por una enzima llamada Drosha produciéndose un pre-miARNs, que son transportados al citoplasma donde se escinde adicionalmente por Dicer para dar lugar al final a los miRNAs. Estos fragmentos de ARN realizan su papel regulador como un componente del complejo RISC, que bien inhibe la traducción de proteínas o promueve la degradación del ARNm<sup>237,239</sup>.

Se han encontrado cerca de 40 miARN que se expresa en las diferentes regiones del genoma VEB<sup>240</sup> y el patrón de expresión de estos genes miARN es dependiente del tipo de célula y expresión génica del VEB. Por ejemplo, mientras que un grupo de miARN de las regiones BamHI-A (BART miRNAs) están expresados en el CNF, un segundo grupo codificado en la región BamHI-H conocidos como BHRFI miARN no se detecta en estas células. Por otra parte, ocurre lo inverso en los linfomas relacionados con el VEB<sup>241</sup>.

Uno de los principales objetivos de miARN BART es la codificación de LMP1, que es un importante oncogén del VEB<sup>108</sup>. Aunque LMP1 tiene propiedades de transformación, la sobreexpresión de esta proteína puede inhibir la proliferación celular e incrementar la susceptibilidad al estrés apoptótico<sup>242</sup>. La supresión de la producción excesiva de LMP1 por BART de miARN parece proteger la expresión de LMP1 de los estímulos apoptóticos y aumentar la resistencia a cisplatino<sup>108</sup>.

Además de los genes miARN, varios miRNAs celulares del VEB, son codificados en las células huésped, se encuentran expresados de forma aberrante en esta neoplasia y tal expresión aberrante puede promover el fenotipo agresivo. Por ejemplo, miR-29c está hipoexpresado en estos tumores en comparación con la mucosa normal de la nasofaringe.

En un estudio sobre los genes diana de miR-29c, se ha observado que codifica proteínas de la matriz extracelular tales como la laminina-g1, que se asocian con la invasividad de las células tumorales y potencial metastásico <sup>243</sup>.

Otros estudios sobre miARN, en el que se reclutaron 13 muestras de CNF y 9 tejidos normales, se observó 35 miARN con expresión alterada en el tumor. Los cambios incluyen la sobreexpresión de miARN oncogénicos tales como el miR-155 y la hipoexpresión de miARN supresores tumorales como miR-34, miR-143, miR31 <sup>244</sup> y mir205 (a través de la vía de p53) <sup>245</sup>. En el análisis computacional de los 22 miRNAs hipoexpresados se demostró que estos se dirigen a varias vías de señalización que se sabe que juegan un papel importante en el desarrollo y la progresión de este tumor. Estos incluyen las vías previamente discutidos Wnt y VEGF, los reguladores del ciclo celular, y las vías de supervivencia celular <sup>246</sup>.

Estos datos juntos indican que el miARN tanto del virus y las células huésped juegan un papel crítico en la mediación de desarrollo y progresión del CNF, pero todavía no tenemos a nuestra disposición toda la información.

## 6. TOPOISOMERASA II ALFA

### 6.1. Topoisomerasas y su función

La estructura del material genético debido a su compleja estructura y su condensación en el núcleo de las células está regulada por enzimas conocidas como topoisomerasas<sup>247, 248, 249, 250, 251</sup>.

Las topoisomerasas son necesarias para la supervivencia de todos los organismos ya que alteran la morfología del DNA mediante la generación de roturas transitorias en la doble hélice que descomprimen el material genético y eliminan el superenrollamiento del ADN para su replicación y posterior compresión de las cadenas<sup>294, 248, 249, 250, 251</sup>.

### 6.2. Tipos de topoisomerasas

Hay dos clases principales de las topoisomerasas, tipo I y tipo II, que se distinguen por el número de cadenas de ADN que escinden y el mecanismo por el que alteran las propiedades morfológicas del material genético<sup>247, 248, 249, 250, 251</sup>.

Las topoisomerasas I son enzimas monoméricas que no requieren ningún cofactor de alta energía<sup>249, 250, 252</sup>. Se clasifican en dos subtipos: IA y IB. Estas enzimas alteran la topología mediante la creación de roturas de una cadena en el ADN de manera transitoria, seguida por el paso de la cadena opuesta intacta (tipo IA) o por la rotación controlada de la hélice alrededor de la rotura (tipo IB)<sup>249, 250, 252</sup>. El tipo IA necesita iones metálicos divalentes para la escisión de ADN y se une covalentemente al de fosfato del extremo 5'-terminal del ADN<sup>249,</sup>

<sup>250, 252</sup>. Por el contrario, las enzimas IB no requieren iones metálicos divalentes y el enlace covalente se realiza en el extremo fosfato 3'-terminal <sup>249, 250, 252</sup>. Como resultado de su mecanismo, las topoisomerasas I pueden modular la comprensión de ADN y la sobretensión, pero no pueden eliminar los nudos o enredos de la hélice de ADN.

Las topoisomerasas tipo II funcionan como homodímeros y requieren iones metálicos divalentes y ATP para la actividad catalítica completa <sup>247, 253, 254, 255</sup>. Estas enzimas seccionan ambas hebras de ADN, desapareciendo el superenrollamiento y volviéndolas a unir <sup>247, 253, 254, 255</sup>.

Existen dos tipos de topoisomerasas tipo II: A (alfa) y B (beta). Estas isoformas difieren en las masas moleculares de sus protómeros (170 frente a 180 kDa, respectivamente) y son codificadas por genes separados <sup>256</sup>.

Las topoisomerasas IIA y IIB muestran un alto grado de similitud en las secuencias de aminoácidos y características enzimológicas. Una diferencia notable entre las dos isoformas es que la topoisomerasa IIA relaja (es decir, elimina) los giros positivos de la hélice, mientras que la isoforma B es incapaz de distinguir la geometría de superenrollamiento de ADN durante la relajación <sup>257</sup>.

Las Topoisomerasas IIA y IIB, tienen distintos patrones de expresión y las funciones celulares separadas.

La topoisomerasa IIA es esencial para la supervivencia de las células en proliferación, y para aumentar los niveles de proteína durante los períodos de crecimiento celular <sup>258</sup>.



La enzima está más sobreexpresada durante el ciclo celular, con un pico de concentración en G2 / M <sup>259</sup>. Se cree que es la isoforma que funciona en los procesos relacionados con el crecimiento, tales como la replicación del ADN y el la segregación de los cromosomas <sup>248</sup>.

La topoisomerasa IIB es prescindible en el nivel celular, pero parece ser necesaria para el desarrollo neuronal adecuado <sup>260</sup>. La expresión de la topoisomerasa IIB es independiente del estado de proliferación y el ciclo celular, y se disocia de los cromosomas durante la mitosis <sup>261</sup>.

La topoisomerasa IIB no puede compensar la pérdida de la topoisomerasa IIA en células de mamíferos, lo que sugiere que estas dos isoformas no juegan papeles redundantes en los procesos de replicación <sup>262</sup>.

### **6.3. Alteraciones y consecuencias: Topoisomerasa II alfa como enzima genotóxica**

Para la activación de la topoisomerasa II alfa (TOPOIIA), previamente se forma un complejo de escisión que consiste en la señalización de unas determinadas moléculas que se coloca en el ADN que sirven como marca para la actuación de la enzima topoisomerasa.

Los complejos de escisión ADN-Topoisomerasa II alfa son de naturaleza transitoria y su concentración celular está estrechamente regulada. La formación de complejos de escisión es esencial para que la topoisomerasa II alfa lleve a cabo las funciones celulares <sup>263</sup>. Si el nivel de los complejos de escisión ADN-topoisomerasa IIA disminuye (es decir, baja la actividad de la

enzima), las células son incapaces de someterse a la segregación cromosómica y, finalmente, mueren por fallo mitótico <sup>264</sup>.

Aunque el complejo de escisión es un intermediario necesario en el ciclo catalítico de la topoisomerasa IIA, además también es potencialmente perjudicial para la célula. Cuando un sistema de secuenciación del ácido nucleico, tal como un complejo de replicación o transcripción, intenta atravesar el complejo de escisión, convierte esta interacción de la enzima con el ADN transitoria en una rotura de doble cadena permanente en el material genético <sup>265</sup>. Las rupturas de la cadena resultantes, así como la inhibición de los procesos de ADN esenciales, inician múltiples vías de recombinación / reparación, induciendo aberraciones cromosómicas <sup>266</sup>.

Si la acumulación de rupturas es alta, desencadenara las vías de apoptosis con el resultado de una muerte celular programada <sup>266</sup>. Si estas roturas de la cadena de ADN no dan lugar a la muerte celular, las translocaciones cromosómicas pueden estar presentes en poblaciones descendientes <sup>266</sup>; por ejemplo, los niveles elevados de topoisomerasa IIA, mediada por escisión de ADN, en seres humanos se ha asociado con translocaciones que implican el gen LLM (leucemia de linaje mixto) en la banda cromosómica 11q23 <sup>267</sup>.

#### **6.4. Topoisomerasa y Cáncer**

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios que investigan la sobreexpresión de TOPOIIA en distintos tumores malignos ya que se piensa que esta enzima puede estar implicada en el proceso carcinogénico, utilizándose incluso inhibidores de la TOPIIA en el tratamiento de distintas neoplasias <sup>268, 269</sup>.

#### 6.4.1. Adenocarcinoma de Mama

Se han llevado a cabo numerosos trabajos centrados en las alteraciones de la topoisomerasa II alfa asociada a la amplificación de HER2 en el carcinoma de mama en mujeres, y su mayor respuesta a las antraciclinas.

La sobreexpresión de HER2 se ha asociado a un peor pronóstico en mujeres con cáncer de mama. En el metaanálisis realizado por Pritchard y cols, al menos ocho ensayos aleatorizados evaluaron la relación entre HER2 y el efecto beneficioso de regímenes terapéuticos con antraciclinas (que son inhibidores de la TOPOIIA) en comparación con los que no utilizaron antraciclinas. Sólo tres de estos estudios fueron significativos estadísticamente, mostrando una interacción entre HER2 y la respuesta a antraciclinas <sup>268</sup>.

Existen evidencias acerca de que la amplificación del gen TOPOIIA comporta una mayor sensibilidad a las antraciclinas en el cáncer de mama metastásico <sup>270</sup>. Parece que la relación entre la expresión de HER2 y TOPIIA se debe a la cercanía entre ambos genes en el cromosoma 17. Sin embargo, Jarvinen et al, han demostrado que el HER2 y TOPIIA no están en el mismo amplicón, y que cuando se amplifica HER2, TOPIIA se elimina con la misma frecuencia que se amplifica <sup>271</sup>.

Los cambios en la TOPIIA a nivel del gen o la proteína pueden aumentar la sensibilidad a las antraciclinas, lo que sugiere que la medición de esta en el tumor podría ser útil en la selección del tratamiento para las mujeres afectas de cáncer de mama con estas características <sup>272</sup>.

Así, dos ensayos aleatorios, han apuntado que la delección o amplificación de TOPIIA es indicativo de un mal pronóstico y predictivo de una mayor respuesta diferencial a terapias con antraciclina <sup>272, 273</sup>.

En uno de estos ensayos, todos los tumores habían amplificado HER2 <sup>273</sup>, pero en el otro ensayo, comparando CMF (Ciclofosfamida, Metotrexate y Fluoracilo) y CEF (Ciclofosfamida, Epirubicina y Fluoracilo), HER2 no fue predictivo de una respuesta diferencial a CEF, incluso en el análisis univariante, mientras que la supresión o amplificación de TOPIIA parecieron ser predictivas de una respuesta diferencial <sup>272</sup>.

Distintos autores han estudiado el valor pronóstico de la expresión del gen TOPIIA, mediante su ARNm y la proteína resultante. Según los resultados del estudio realizado por Jan C. Brase et al, en el cual se estudiaron ambos escalones de la expresión genética, la amplificación del gen TOPIIA no se correlacionó con la expresión de su proteínas (p 0,283), pero si mostró una asociación con la expresión del gen (p 0,047). Por el contrario, los niveles de del gen TOPIIA y ARN se correlacionaron con expresión de la proteína (P <0,001). La expresión del gen TOPIIA se relacionó con el intervalo libre de metástasis (p <0,001) y se asoció con la remisión completa de pacientes tratados con CE (Ciclofosfamida y Epirubicina, p 0,002). Según estos resultados, serían más útiles las técnicas centradas en valorar la expresión del gen TOPIIA y su ARN <sup>274</sup>

#### 6.4.2. Carcinoma No Microcítico de Pulmón

La expresión de la topoisomerasa II alfa en el carcinoma no microcítico de pulmón también ha sido valorada en estos últimos años. Merece destacar la investigación de Huan Huang y cols., donde se evaluó la expresión de TOPOIIA en relación con la aparición de metástasis cerebrales y con la multirresistencia a quimioterápicos. Estos autores evaluaron un total de 286 pacientes con carcinoma no microcítico sometidos a cirugía curativa entre 2007 y 2013. La expresión positiva para TOPIIA fue de 37,8%, asociándose significativamente con el consumo de tabaco de los pacientes ( $p < 0,05$ ). El grupo de pacientes con tumores con expresión positiva para la TOPOIIA presentó tasas de supervivencia libre de metástasis cerebrales a los 2 años significativamente inferiores que el grupo negativo (84,2% vs. 93,4%,  $p = 0,030$ ). El análisis multivariante mostró que la expresión TOP2A era un factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de metástasis cerebrales ( $P < 0,05$ )

275

#### 6.4.3. Adenocarcinoma de colón

También se ha estudiado la expresión de TOPOIIA en el adenocarcinoma metastásico de colon refractario a tratamiento, y su respuesta a antraciclinas.

Actualmente está en desarrollo un ensayo en fase II, donde Line et al incluyeron pacientes con adenocarcinoma de colon metastásico que no habían respondido a la quimioterapia paliativa convencional con oxiplatino y con sobreexpresión de TOPOIIA evaluada mediante FISH, esperándose una tasa de respuesta del 30%, significativamente mejor que la segunda línea

convencional de tratamiento, que por lo general tiene tasas de respuesta de 10%.

En conclusión, si se cumplen los objetivos de este protocolo de estudio, al esperado 10% de los pacientes con metástasis de adenocarcinoma de colon no resecables, con sobreexpresión de TOPIIA, se le podrá ofrecer una línea adicional de tratamiento eficaz, lo que podría conducir a una mejora de la supervivencia global en este subgrupo de pacientes <sup>276</sup>.

#### 6.4.4. Hepatocarcinoma

La ganancia genómica representa un mecanismo importante en la activación de proto-oncogenes.

Wong et al, examinaron 7 localizaciones usuales para genes sobreexpresados en el hepatocarcinoma (HCC) utilizando técnicas de *arrays*. En 22 líneas celulares de HCC, se indicaron los grupos de genes regulados, donde la expresión TOPIIA fue clasificada como la más alta. Por el análisis de microarrays de tejidos de 172 HCC, encontraron expresiones TOPIIA correlacionados con el grado histológico ( $p < 0,001$ ), la invasión microvascular ( $p 0,004$ ) y un inicio a edades tempranas de la neoplasia ( $\leq 40$  años;  $p 0,007$ ).

La expresión de TOPIIA se evaluó adicionalmente por su asociación con la capacidad de respuesta de la quimioterapia y la supervivencia en 148 pacientes en un estudio prospectivo y aleatorizado de fase III. Incluyeron 73 pacientes quimioresistentes y 75 no resistentes, mostrando solamente positividad para TOPIIA correlacionada con la quimio-resistencia ( $p 0,029$ ) y

corta supervivencia de los pacientes ( $p < 0,0001$ ). El valor terapéutico potencial en la orientación TOPIIA por etopósido, como agente único y en combinación con doxorubicina, también fue evaluado. Estudios in vitro citotóxicos indican que la combinación de etopósido con doxorubicina reduce el número de células tumorales en comparación con la doxorubicina exclusiva ( $p < 0,028$ )<sup>277</sup>.

Este estudio pone en relieve por primera vez el valor pronóstico de TOPIIA en el hepatocarcinoma y el uso potencial de los agentes reactivos TOPIIA en la terapia.

#### 6.4.5. Sarcomas de partes blandas

Existen numerosas publicaciones que relacionan la expresión de la topoisomerasa II alfa con los sarcomas de partes blandas. En la publicación de Werneck y cols<sup>278</sup>, se realizó un análisis mediante FISH e inmunohistoquímica para valorar la expresión de TOPIIA, entre otros, en los sarcomas de partes blandas en comparación con los tumores de partes blandas benignos (fibromatosos y desmoides). Los resultados mostraron una mayor expresión de la TOPIIA en los sarcomas de partes blandas. Además la expresión de esta enzima también presentó correlación con la supervivencia, aunque como en los estudios en referencia al carcinoma de mama, también se mostró una discordancia entre la expresión génica y la de las proteínas<sup>278</sup>. Gobble et al analizaron la expresión de la topoisomerasa en los liposarcomas, comparándola con muestras de tejido adiposo normal, obteniendo resultados similares a los anteriores<sup>279</sup>.

Estos resultados se reproducen en los liposarcomas bien diferenciados e indiferenciados, encontrándose sobreexpresada la enzima en estos últimos<sup>280</sup>. Actualmente, la mayoría de las antraciclinas y otros quimioterápicos que actúan sobre la TOPIIA tienen pobre potencia sobre esta. Los resultados actuales sugieren que la creación de agentes dirigidos de manera más específica frente a la TOPIIA puede suponer un arsenal terapéutico en pacientes con liposarcoma<sup>281</sup>. Así, se están desarrollándose agentes como el NK314<sup>282, 283</sup>.

### **6.5. Topoisomerasa II alfa y carcinoma de nasofaringe**

En cuanto a la expresión de la topoisomerasa II alfa en el carcinoma de nasofaringe, solo existe una publicación de impacto disponible en la bibliografía actual. Esta fue publicada por Lan J et al, en 2014 y en ella se realizó el análisis de 124 pacientes con carcinoma de cavum que recibieron tratamiento estándar. Se incluyeron tumores en estadios iniciales y avanzados con una mediana de seguimiento de 67 meses. Los pacientes con estadio II-IV además de la radioterapia convencional recibieron tratamiento concomitante con quimioterapia con cisplatino, basado en los resultados del Intergrupo 099. Los autores evaluaron la expresión de la TOPOIIA mediante inmunohistoquímica, concluyendo su valor como factor pronóstico independiente y significativo<sup>284</sup>.





## II. OBJETIVOS

**1. Objetivo principal**

- Investigar el papel de la topoisomerasa II alfa como factor pronóstico y predictivo en pacientes con carcinoma de nasofaringe tratados en el Hospital Clínico Virgen de la Victoria.

**2. Objetivos secundarios**

- Determinar la incidencia de sobreexpresión de la topoisomerasa II alfa en el carcinoma de nasofaringe.
- Analizar la asociación entre la expresión de la topoisomerasa II alfa y distintos factores pronósticos, tales como edad, sexo, estadio tumoral, histología, diferenciación tumoral, afectación del espacio retrofaríngeo, afectación de pares craneales y erosión de base de cráneo.
- Estudiar si la expresión de la topoisomerasa se asocia a una peor respuesta al tratamiento con radioquimioterapia
- Determinar si la expresión de topoisomerasa II alfa es un factor pronóstico de supervivencia global y libre de enfermedad en el cáncer de nasofaringe.

### III. MATERIAL Y MÉTODOS

## **1. CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA**

En este estudio se han incluido 58 pacientes consecutivos diagnosticados de carcinoma de nasofaringe en los servicios de Otorrinolaringología del Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, Hospital de la Serranía de Ronda y Hospital Costa del Sol de Marbella entre 1995 y 2011. Todos ellos cuentan con una confirmación histológica mediante estudio en hematoxilina-eosina de biopsias obtenidas bajo cirugía endoscopia nasal.

Todos los pacientes fueron evaluados en el Comité Oncológico de Tumores de Cabeza y Cuello, constituido en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria de Málaga, que reúne a especialistas de Otorrinolaringología (ORL), Oncología Médica, Oncología Radioterápica y Anatomía Patológica con el objeto de tomar decisiones multidisciplinarias sobre la actitud terapéutica en cada caso clínico de neoplasia en este territorio. El periodo de seguimiento fue el comprendido desde el momento del diagnóstico histológico hasta su fallecimiento o hasta el 31 de Diciembre del 2011, fecha de la última actualización de la base de datos confeccionada para este estudio.

### **1.1. Criterios de inclusión**

En este estudio se incluyeron todos los pacientes diagnosticados de carcinoma nasofaríngeo con confirmación anatomopatológica, independientemente de las características histológicas y clínicas.

## **1.2. Criterios de exclusión**

Se excluyeron aquellos pacientes que en el momento del diagnóstico presentaban otra neoplasia maligna.

## **1.3. Protocolos terapéuticos**

Debido a que el periodo de inclusión de los pacientes se extendía desde el año 1997 hasta 2011, se utilizaron distintos protocolos terapéuticos.

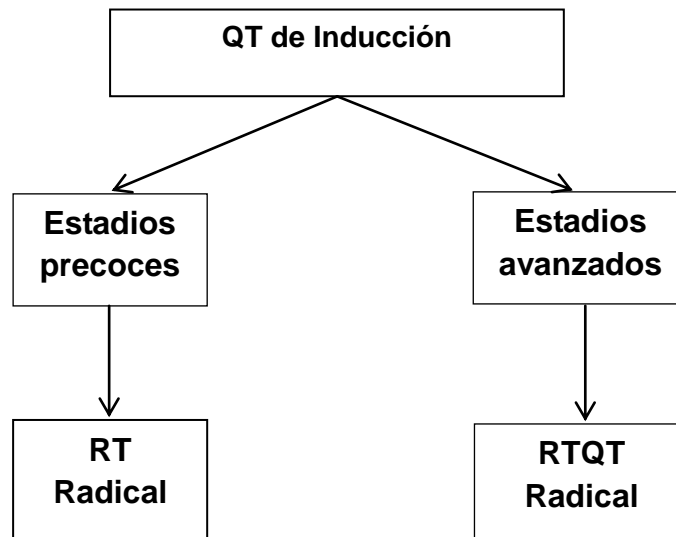
En orden cronológico, el primer protocolo utilizado consistió en 3 ciclos de quimioterapia de inducción con una duración de 5 días cada uno, y separados 3 semanas entre sí, según el siguiente protocolo:

- Cisplatino (CDDP) 100 mg/m<sup>2</sup> intravenoso (el primer día del ciclo) + 5 Fluouracilo 1000 mg/m<sup>2</sup>/día en infusión continua (durante los 5 días del ciclo).

Las respuestas a la QT fueron valoradas a las 4 semanas del fin de la misma y catalogadas como respuesta completa (RC), respuesta parcial (RP), estabilización o progresión. Tras ello se administró, en los casos de RC y RP radioterapia o radioquimioterapia con intención radical en función del estadio tumoral.

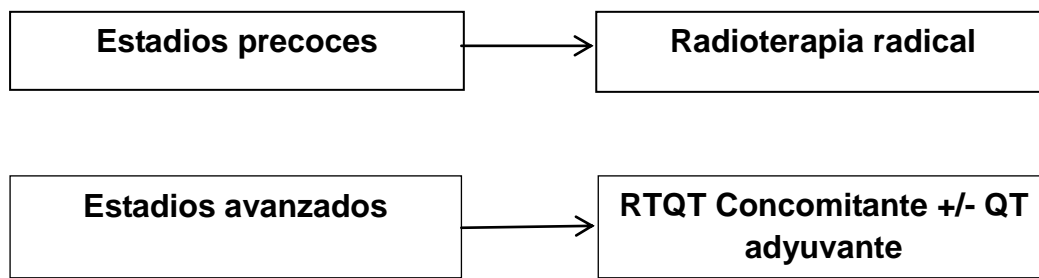
La dosis de irradiación sobre el tumor primario y ganglios clínicamente positivos fue de 70 Gy administrados en 35 fracciones de 2 Gy cada una durante un periodo de siete semanas. Los niveles ganglionares II, III, IV, V y retrofaringeos fueron irradiados con un mínimo de 50 Gy.

En los casos más avanzados, tras la quimioterapia de inducción se realizó tratamiento con 3 ciclos de cisplatino, a dosis  $100\text{mg}/\text{m}^2$  cada 3 semanas de manera concomitante a la radioterapia.



En el año 2001, a raíz de los resultados del Intergrupo 099, el tratamiento estándar de los tumores avanzados cambió hacia la combinación de la radioterapia y quimioterapia concomitante seguida de quimioterapia adyuvante según las características tumorales.

De esta manera, a partir de esta fecha, los estadios precoces recibieron radioterapia radical con las características descritas previamente. Los estadios avanzados en cambio, se trataron con 3 ciclos de quimioterapia basados en el cisplatino de forma concomitante con radioterapia. En los casos más avanzados y con peor pronóstico se aplicaba 3 ciclos de quimioterapia adyuvante tras la terapia combinada.



#### 1.4. Seguimiento

Durante la aplicación del tratamiento, en el esquema con quimioterapia de inducción, se realizó exploración física y endoscópica por ORL después de cada ciclo de QT, así como TC cervical tras el tercer ciclo y a los 3 meses del fin de la RT o RTQT.

Cuando se utilizó el esquema basado en el Intergrupo 099, se realizó la exploración física, endoscópica y TC a los 3 meses de finalizar el tratamiento, además del seguimiento durante las sesiones de tratamiento.

Tras la finalización de los protocolos, todos los pacientes siguieron revisiones rutinarias en las consultas de ORL y Oncología que incluyeron valoración endoscópica así como la realización de exploraciones complementarias, tanto de laboratorio como de imagen, según la siguiente periodicidad:

1º - 2º año:

- Exploración física y ORL cada 3 - 4 meses.
- Radiografía (Rx) de tórax y analítica general cada 6 – 8 meses.
- TC/RMN cervical y serología VEB.

3º - 5º año:

- Exploración física y ORL cada 6 meses.
- Analítica general y serología VEB cada 6 meses.
- TC/RMN cervical y Rx tórax anuales.

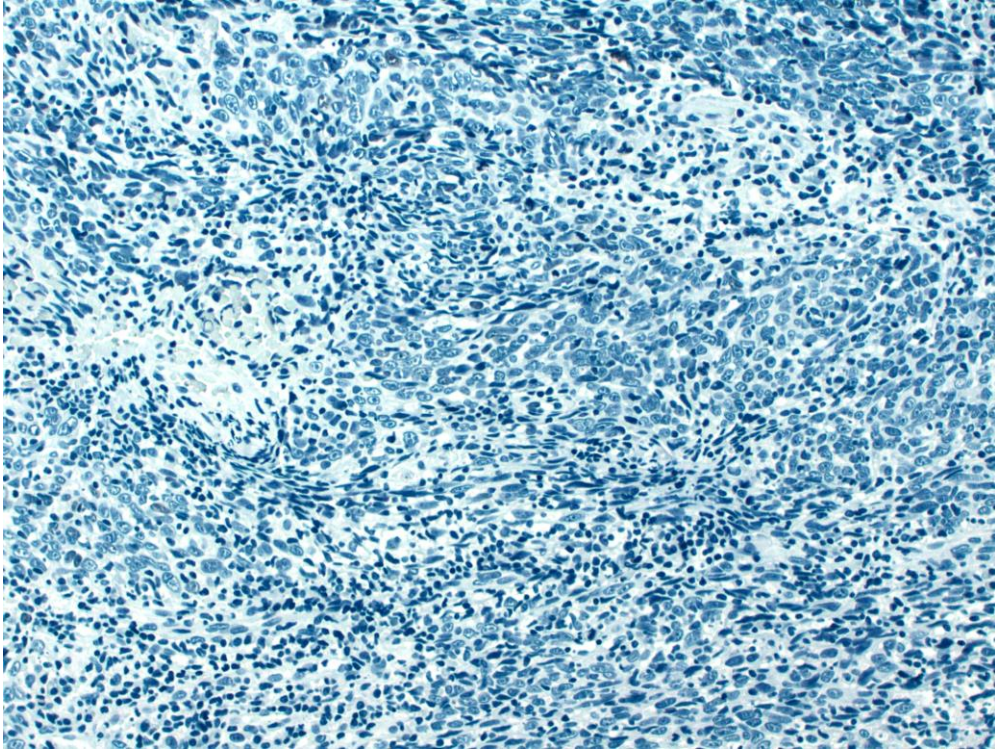
Posteriormente:

- Exploración física y ORL anuales.
- Analítica, Serología y Rx tórax anuales.

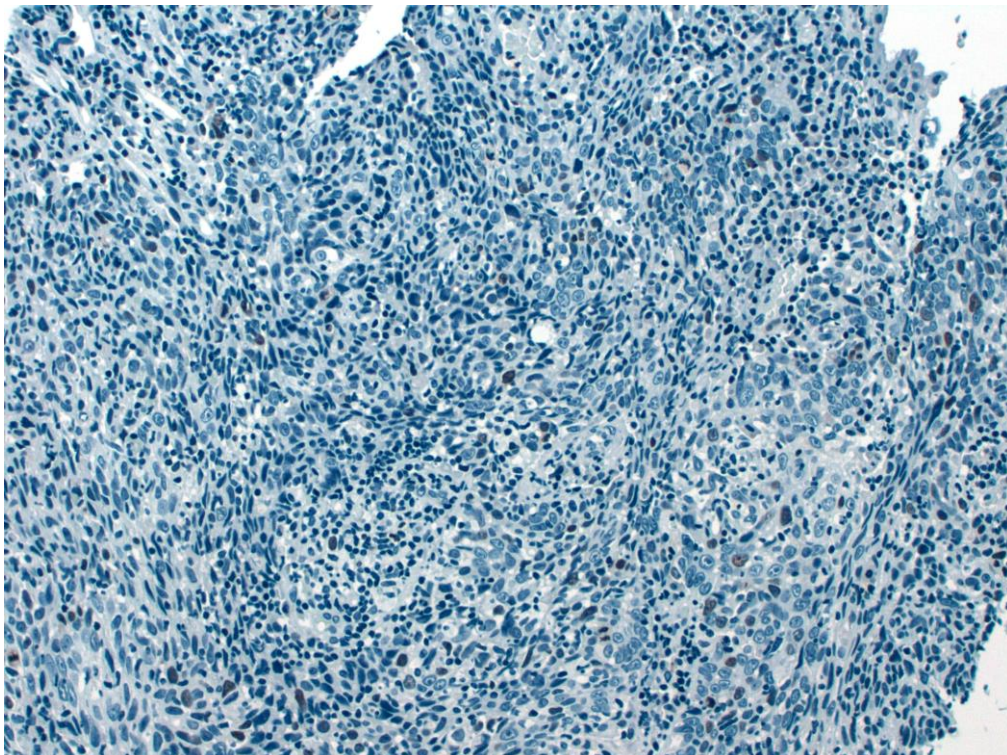


## **2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO**

Para el estudio inmunohistoquímico se realizaron cortes de 5 micras sobre portaobjetos tratados (DAKO). A continuación se lavaron con solución salina tamponada con Tris durante 15 min y después se incubaron con un anticuerpo monoclonal primario de orientación TOPIIA (1: 200, EP1102Y, Epitomics) durante 1 h. Los anticuerpos primarios se detectaron usando el kit ChemMate EnVision (Dako, K5001, Carpinteria, CA). Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo secundario durante 30 min, desarrollado con 3,3-diaminobenzidina durante 5 min, y luego contraste con hematoxilina. Sin conocimiento previo de la información clínica, las tinciones fueron visualizadas por dos patólogos. Se valoraron dos características, una de ellas fue el porcentaje de expresión de las células y la otra fue la intensidad de la expresión. La puntuación fue registrada desde 0 a 4, de acuerdo con el porcentaje de células neoplásicas inmunoteñidas con el anticuerpo (0 < 1; 1 = 1-10; 2 = 11-25; 3 = 26-50; y 4 > 50%). La puntuación de la intensidad se clasificó de 0 a 3 (0 = negativo; 1 = tinción débil; 2 = tinción moderada; 3 = fuerte tinción). Tras ello se tomó el valor superior del intervalo del porcentaje de células inmunoteñidas y se multiplicó por el nivel de intensidad. Así se obtuvo un intervalo donde los valores oscilaban desde 0 a 300. Consideramos como positivo para la expresión valores comprendidos entre 51-300 y negativos el intervalo 0-50.

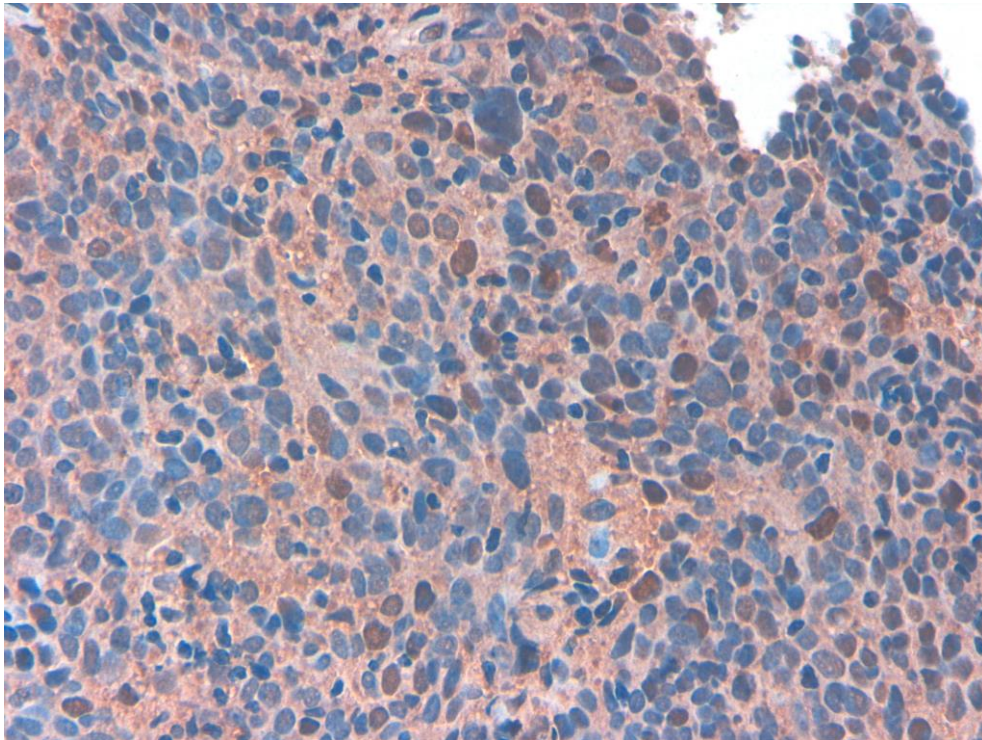


Tinción negativa para topoisomerasa II alfa

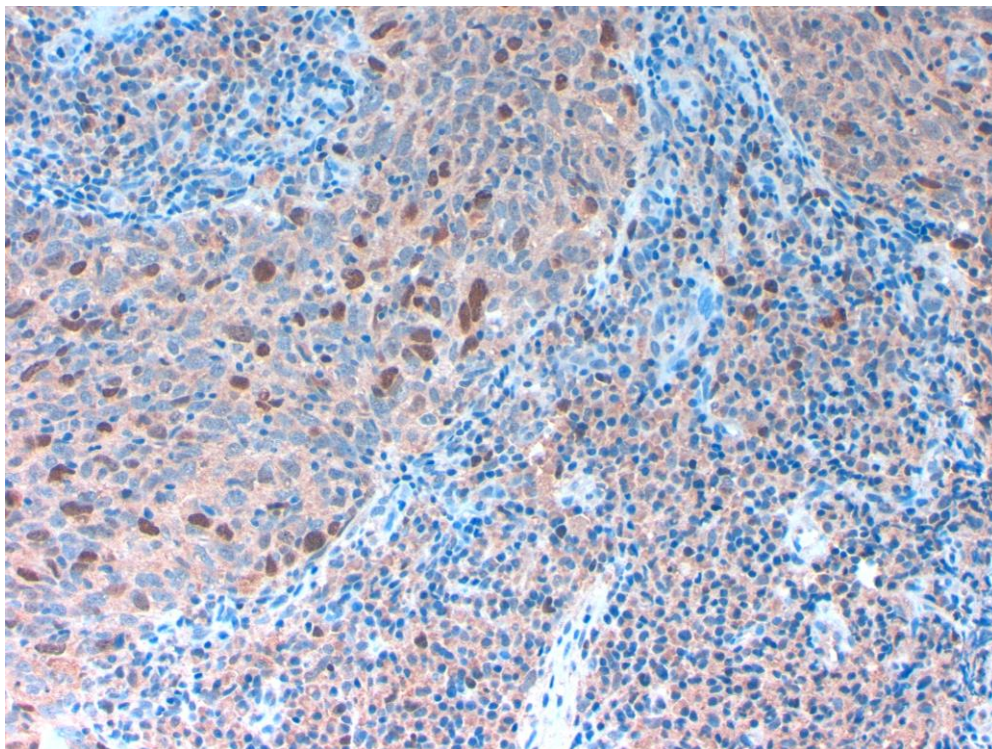


Tinción con porcentaje de 1 e intensidad 1.



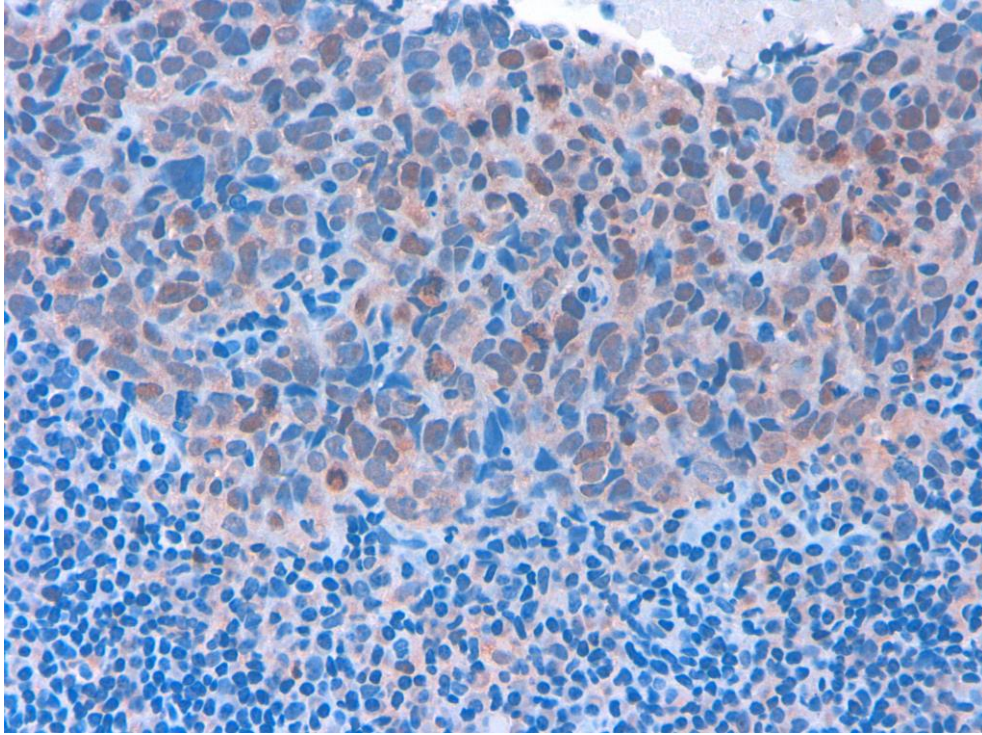


Tinción con porcentaje de 2 e intensidad 2.

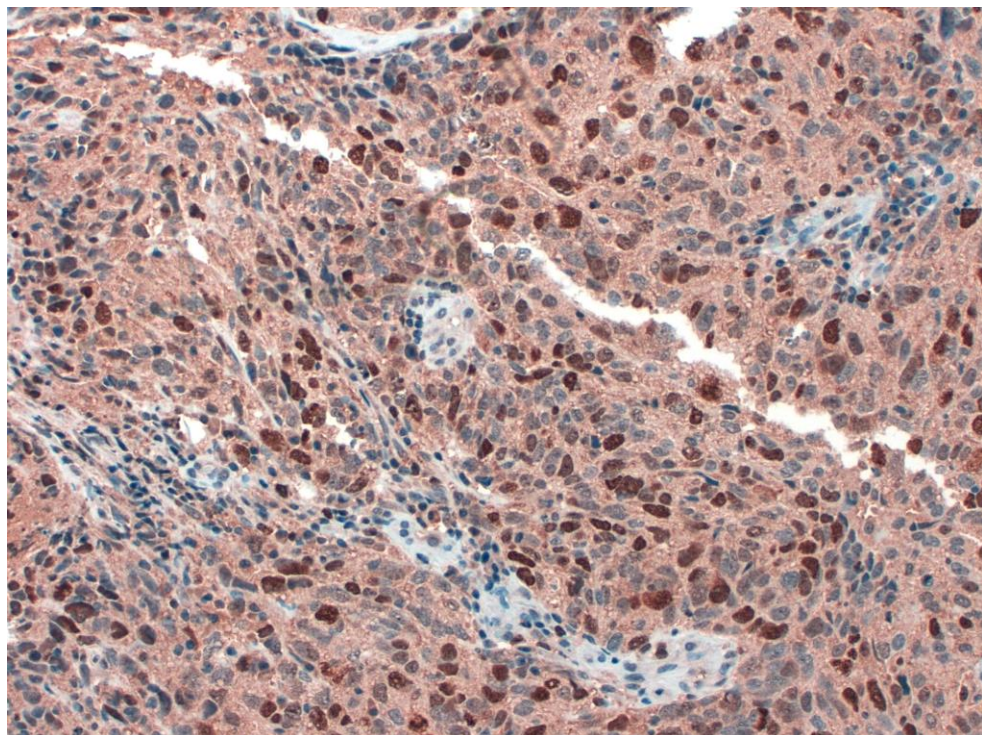


Tinción con porcentaje de 2 e intensidad 3.





Tinción con porcentaje de 4 e intensidad 1.



Tinción con porcentaje de 3 e intensidad 3.

### **3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los datos de los 58 pacientes incluidos se introdujeron en una base de datos confeccionada en el programa Access 2010 incluyendo un total de 67 variables referentes al paciente, neoplasia y estudio inmunohistoquímico de las biopsias, así como del tratamiento administrado, tasas de respuesta al mismo y estado final. A cada paciente se le asignó un número identificador incluido en un formulario principal denominado “Datos Personales”, al que se vincularon el resto de los subformularios que recogen las distintas variables cuantitativas, cualitativas y tipo fecha o texto con sus respectivas categorías. Los datos recabados se procesaron mediante el programa SPSS 17.0 para su análisis estadístico.

Todas las variables consideradas se sometieron previamente a un estudio estadístico descriptivo básico. Las variables cuantitativas fueron evaluadas por su valor numérico real, tomando la media aritmética y la desviación típica como parámetros de centralización y dispersión respectivamente. Las variables cualitativas se distribuyeron en categorías calculando las frecuencias absolutas y relativas de cada una de ellas.

Posteriormente, mediante aplicación de métodos estadísticos univariantes, se asociaron las distintas variables entre sí con el objeto de conocer la interrelación entre las principales características tumorales y del propio paciente con los aspectos clínico-terapéuticos más relevantes y con la TOPOIIA. Las variables cualitativas se evaluaron por medio de tablas de contingencia, aplicando el test de Chi cuadrado o mediante la prueba del estadístico exacto de Fisher, considerando siempre que las celdas tuviesen una frecuencia esperada mayor de 5 (porcentaje inferior al 30%). En las variables

cuantitativas, para comparar la igualdad o no de los valores en los grupos analizados, se comprobó previamente la normalidad e igualdad de la varianza. Si se aceptaba la hipótesis nula (de igualdad de estadísticos), se aplicó el test de la T de Student (en todos los casos la variable categórica tenía dos grupos). Del mismo modo, para establecer la correlación entre variables continuas se empleó el coeficiente de Pearson. En todos los casos, se tomó como valor estadísticamente significativo  $p < 0,05$  o nivel de confianza del 95%.

En todos los pacientes, se estudió mediante curvas de Kaplan-Meier la supervivencia global (SVG), considerando el tiempo en meses desde el diagnóstico hasta la muerte del paciente y el tiempo hasta la primera recidiva y/o progresión (TLP). Estos tiempos se relacionaron con variables clínico-terapéuticas y tumorales seleccionadas, y las curvas resultantes se compararon mediante los test de Long-Rank y Wilcoxon con el objeto de conocer las diferencias significativas.

Se completó el análisis de los datos con un estudio multivariante, utilizando la técnica de regresión de Cox, indicado cuando la variable dependiente está relacionada con la supervivencia de un grupo de sujetos. Con ello, hemos pretendido valorar simultáneamente el efecto independiente tanto de aquellos factores de riesgo con resultado significativo en el univariante (nivel de significación estadística  $p < 0.05$ ) como aquellos que tenían cierto interés o relevancia en el estudio. Todas las variables introducidas en el modelo fueron categóricas dicotómicas.

A partir de los valores de hazard ratio (Exp (B)) asociados a cada una de las variables independientes, la significación de las mismas y los intervalos de confianza al 95%, permitieron valorar cuál fue el efecto de cada una de ellas sobre la función de supervivencia.

## IV. RESULTADOS



## 1. ESTADÍSTICA DESCRIPTIVA

### 1.1. Características generales de la muestra

Se analizaron un total de 58 pacientes con un claro predominio de varones (47 varones y 11 mujeres, 81% y 19% respectivamente) y una edad media en el momento del diagnóstico histológico de 50 años (mediana de 52 años con una desviación típica de 14 y rango de 17 a 82). La mayoría de los pacientes fueron de origen caucásico con un 79,3%, seguido por la etnia arábiga (19%) y por último los asiáticos (1,7%).

El 50% de los pacientes eran fumadores activos.

### 1.2. Características Tumorales

La distribución de la muestra por estadios según la séptima edición de la AJCC<sup>285</sup> (Tabla 4, Anexo III) fue la siguiente: estadio I 15,5% (9 casos), estadio II 6,9% (4), estadio III 34,5% (20) y estadio IV 43,1% (25).

Tabla 1: Estadio Tumoral

<b>Estadio I</b>	9 (15,5%)
<b>Estadio II</b>	4 (6,9%)
<b>Estadio III</b>	20 (34,5%)
<b>Estadio IV</b>	25 (43,1%)

En cuanto a la categoría de T según la clasificación TNM de AJCC <sup>285</sup> (Tabla 1-3, Anexo III), el 25,9% fueron catalogados de T1, 24,1% T2, 17,2% T3 y 31% T4. Uno de los pacientes no fue clasificado en la categoría T por tener un estadio avanzado con metástasis a distancia.

Tabla 2: Categoría T

<b>T1</b>	15 (25,9%)
<b>T2</b>	14 (24,1%)
<b>T3</b>	10 (17,2%)
<b>T4</b>	18 (31%)

En la categoría de N, la distribución fue la siguiente: N0 32,8%, N1 10,3%, N2 39,7%, N3a 15,5% y N3b 1,7%. En resumen, el 32,8% no presentaban adenopatías en el momento del diagnóstico mientras que el 67,2% si las presentaban.

Tabla 3: Categoría N

<b>N0</b>	19 (32,8%)
<b>N1</b>	6 (10,3%)
<b>N2</b>	23 (39,7%)
<b>N3a</b>	9 (15,5%)
<b>N3b</b>	1 (1,7%)

Un 10,3% de la muestra presentaban metástasis a distancia en el momento del diagnóstico.

Tabla 4: Categoría M

<b>M0</b>	52 (89,7%)
<b>M1</b>	6 (10,3%)

Se estudiaron tres variables clínico-radiológicas que fueron: invasión de espacio retrofaríngeo, afectación de pares craneales y erosión de la base del cráneo. Estos criterios fueron positivos en el 27,6% (16 casos), 8,6% (5) y 25,9% (15) respectivamente.

Tabla 5: Invasión espacio retrofaríngeo / Afectación pares craneales / Erosión de la base del cráneo

<b>Invasión espacio retrofaríngeo</b>	16 (27,6%)
<b>Afectación pares craneales</b>	5 (8,6%)
<b>Erosión base del cráneo</b>	15 (25,9%)

### 1.3. Características histológicas

Según la clasificación histológica de la OMS el 20,7 % de los tumores correspondieron a carcinoma escamoso queratinizante, el 19% a carcinoma escamoso no queratinizante diferenciado y el 60,3% a carcinoma indiferenciado. En este estudio, dado el tamaño de la muestra, se agruparon dichos tipos histológicos en 2 grupos: carcinomas escamosos queratinizantes (20,7%) y carcinomas escamosos no queratinizantes (79,3%).

Tabla 6: Clasificación según la OMS

<b>Carcinoma escamoso queratinizado</b>	12 (20,7%)
<b>Carcinoma escamoso no queratinizado diferenciado</b>	11 (19%)
<b>Carcinoma indiferenciado</b>	35 (60,3%)

### 1.4. Estudio de la Topoisomerasa II Alfa (TOPOIIA)

La presencia de TOPOIIA fue analizada en las biopsias de todos los pacientes de la serie, encontrándose una expresión positiva en el 44,8 % frente al 55,2 % donde fue negativa.

Tabla 7: Expresión de la TOPOIIA

<b>TOPOIIA Negativa (<math>\leq 50</math>)</b>	32 (55,2%)
<b>TOPOIIA Positiva (<math>&gt; 50</math>)</b>	26 (44,8%)

### 1.5. Tratamiento y evolución clínica

Entre los distintos esquemas terapéuticos utilizados la distribución fue: quimioterapia de inducción junto con radioterapia 15,5%, quimioterapia de inducción junto con radioquimioterapia 13,8%, radioterapia radical 22,4%, radioterapia y quimioterapia concomitante 39,7%. Cabe destacar que 3 pacientes de la muestra recibieron tratamiento paliativo, lo que supone un 5,2%, y que 2 pacientes decidieron no recibir tratamiento, lo que corresponde al 3,4%.

Tabla 8: Esquemas terapéuticos

<b>Inducción + RT</b>	9 (15,5%)
<b>Inducción + RTQT</b>	8 (13,8%)
<b>RT radical</b>	13 (22,4%)
<b>RTQT concomitante</b>	23 (39,7%)
<b>Paliativo</b>	3 (5,2%)
<b>No reciben tratamiento</b>	2 (3,4%)

Del total de pacientes analizados, 17 pacientes recibieron quimioterapia de inducción de los cuales realizaron una respuesta completa 15 de ellos (88%), siendo esta respuesta parcial en 2 (12%). Posteriormente, todos estos pacientes fueron sometidos a radioterapia radical o radioterapia con quimioterapia concomitante en los estadios precoces y avanzados respectivamente (tabla 9).

Como se puede apreciar en la tabla 10, el análisis de los resultados tras el tratamiento primario (evaluados a los 3 meses de finalizar el mismo) fue:

respuesta completa 77,6% (45 casos), respuesta parcial 6,9% (4) y progresión de la enfermedad 12% (7).

Tras un seguimiento de 56 meses, el 20,7 % (12 casos) de los pacientes presentó una recidiva (tabla 11). Estos pacientes recibieron tratamiento de rescate con radioterapia, radioquimioterapia y/o cirugía (tabla 12). De todos los pacientes rescatados, 2 de ellos presentaron una respuesta completa (1 tras vaciamiento cervical y el otro tras recibir radioquimioterapia concomitante), 2 obtuvieron una respuesta parcial, 2 se mantuvieron con estabilización (progresando en meses posteriores) y los 6 casos restantes progresaron (tabla 13).

Tabla 9: Respuesta a la quimioterapia de inducción

<b>RC tras QT inducción</b>	15 (88%)
<b>RP tras QT inducción</b>	2 (12%)

Tabla 10: Respuesta al tratamiento primario

<b>RC</b>	45 (77,6%)
<b>RP</b>	4 (6,9%)
<b>Estabilización</b>	0 (0%)
<b>Progresión</b>	7 (12%)

Tabla 11: Recidiva

<b>Recidiva tras 1º tratamiento</b>	12 (21,4%)
<b>No recidiva tras 1º tratamiento</b>	44 (78,6%)

Tabla 12: Esquemas terapéuticos de tratamiento de recidiva

<b>RT</b>	1 (8%)
<b>QT</b>	6 (50%)
<b>Cirugía</b>	1 (8%)
<b>RTQT</b>	3 (25%)
<b>RTQTQx</b>	1 (8%)

Tabla 13: Respuesta al tratamiento de rescate

<b>RC</b>	2 (16,6%)
<b>RP</b>	2 (16,6%)
<b>Estabilización</b>	2 (16,6%)
<b>Progresión</b>	6 (50%)

En la fecha de finalización del estudio, 32 pacientes (55,1%) se encontraban vivos y 25 (44,9%) habían fallecido. De los pacientes vivos, 2 presentaban enfermedad (3,4%). De los 25 pacientes fallecidos, 23 fallecieron por causa tumoral (39,7%) y 3 pacientes por otras causa (2 de ellos por segundos tumores primarios).

Tabla 14: Estado del último control

<b>VSE</b>	30 (51,7%)
<b>VCE</b>	2 (3,4%)
<b>Exitus por tumor</b>	23 (39,7%)
<b>Exitus por otra causa</b>	3 (5,2%)

## 2. ESTADÍSTICA ANALÍTICA

En esta etapa del estudio, se exponen los resultados obtenidos al interrelacionar distintas variables entre si según la metodología señalada anteriormente. Se realizó una selección de las variables a comparar con el objeto de obtener información útil y evitar la posibilidad de acumular error que provocaría un enfrentamiento indiscriminado de todas las variables entre sí.

### 2.1. Inmunohistoquímica:

Al relacionar la expresión de la TOPOIIA con la categoría T de la clasificación TNM, encontramos asociaciones estadísticamente significativas ( $p = 0,042$ ), presentándose en los T1 una mayor expresión de la TOPOIIA (66,7% de todos los T1), que fue descendiendo en categorías mayores, T2 y T3 presentaron porcentaje de expresión del 35,7% y 10% respectivamente. Dentro de T4 donde los porcentajes fueron similares entre la positividad o no de la expresión de TOPOIIA (55,6% vs 44,4%).



Tabla 15: Expresión de TOPOIIA/Categoría T

<b>TOPOIIA/Categoría T</b>	TOPOIIA -	TOPOIIA +	Total
T1	5 (33,3%)	10 (66,7%)	15 (100%)
T2	9 (64,3%)	5 (35,7%)	14 (100%)
T3	9 (90%)	1 (10%)	10 (100%)
T4	8 (44,4%)	10 (55,6%)	18 (100%)

P= 0,04

Asimismo, se objetivaron asociaciones con tendencia a la significación ( $p = 0,052$ ) entre la expresión de TOPOIIA y variables relativas al tumor como la categoría N y M. La categoría N mostró una tendencia a tener mayor expresión de la topoisomerasa en N precoces (N0-N1) frente a N avanzados (N2-N3).

Tabla 16: Expresión de TOPOIIA/Categoría N

<b>TOPOIIA/Categoría N</b>	TOPOIIA -	TOPOIIA +	Total
N0	8 (42,1%)	11 (57,9%)	19 (100%)
N1	1 (16,7%)	5 (83,3%)	6 (100%)
N2	16 (69,6%)	7 (30,4%)	23 (100%)
N3	7 (70%)	3 (30%)	10 (100%)

P= 0,052

Tabla 17: Expresión de TOPOIIA/Categoría M

<b>TOPOIIA/Categoría M</b>	<b>TOPOIIA -</b>	<b>TOPOIIA +</b>	<b>Total</b>
M0	30 (51,7%)	22 (42,3%)	52 (89,7%)
M1	2 (3,4%)	4 (6,9%)	6 (10,3%)
Total	32 (55,2%)	26 (44,8%)	58 (100%)

P= 0,25

En cuanto a la relación de la expresión de TOPOIIA y el estadio (dividido en estadios precoces y avanzados), se mostró mayor expresión de dicha enzima en estadios precoces (76,9% de los estadios precoces eran positivos para la TOPOIIA) frente los estadios avanzados (solo el 35,6%), con una p 0,008.

Tabla 18: Expresión TOPOIIA/Estadio

<b>TOPOIIA/Estadio</b>	<b>TOPOIIA -</b>	<b>TOPOIIA +</b>	<b>Total</b>
Estadios precoces	3 (23,1%)	10 (76,9%)	13 (100%)
Estadios avanzados	29 (64,4%)	16 (35,6%)	45 (100%)

P= 0,008

No se objetivaron asociaciones estadísticamente significativas entre la expresión de la TOPOIIA y la histología. Por otro lado tampoco se hallaron diferencias al clasificar los grupos histológicos en queratinizantes y no queratinizantes (tabla 20; Anexo I).

Los parámetros clínicos-radiológicos, invasión del espacio retrofaríngeo, afectación pares craneales y erosión de la base del cráneo, tampoco tuvieron

una relación significativa estadísticamente con la expresión de TOPOIIA (tabla 21; Anexo I).

Al analizar la respuesta al tratamiento primario se observó que en los casos con respuesta completa y parcial presentaron una expresión baja de TOPOIIA (60% y 75% respectivamente), frente a una expresión alta en los pacientes con estabilización y progresión de la enfermedad, con porcentajes de expresión del 100% (p 0,02)

Tabla 19: Expresión TOPOIIA/Respuesta a tratamiento primario

<b>TOPOIIA/Respuesta a tto</b>	TOPOIIA -	TOPOIIA +	Total
RC	27 (60%)	18 (40%)	45 (100%)
RP	3 (75%)	1 (25%)	4 (100%)
Estabilización	0	6 (100%)	6 (100%)
Progresión	0	1 (100%)	1 (100%)

P= 0,02

Relacionando la variable de recidiva y estado en último control con la expresión de TOPOIIA, no se objetivaron resultados significativos (Tabla 22-23, Anexo I)

## **2.2. Evolución clínica y supervivencia**

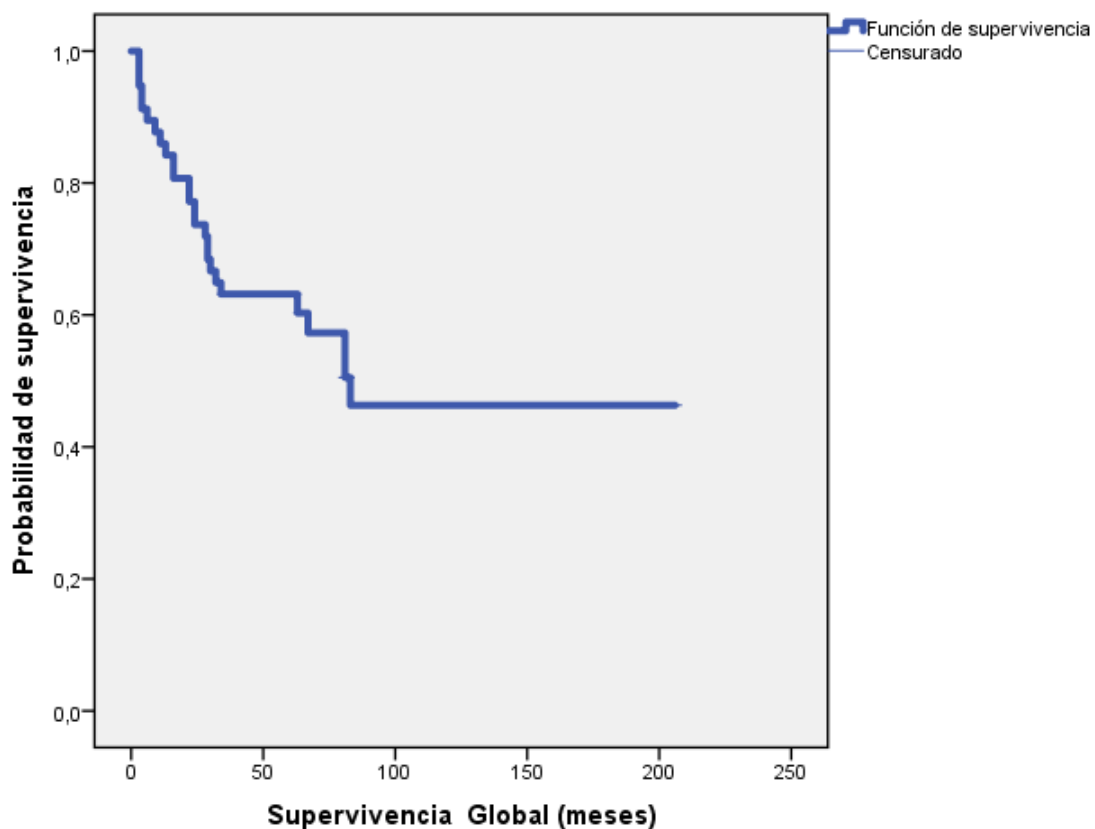
### **2.2.1. Supervivencia Global (SVG)**

En el momento del cierre del periodo de estudio, el seguimiento medio de toda la serie fue de 56 meses (mediana de 49 meses, rango de 3 a 206 meses) y de 74 meses (mediana de 64 meses, rango de 35 a 206 meses) en los pacientes vivos.

De los 58 pacientes de la serie, 26 habían fallecido (3 de ellos por otras causas, 2 por segundas neoplasias) mientras que 30 permanecían vivos sin enfermedad (51,7 %) y 2 pacientes vivos con enfermedad.

La mediana de SVG de la serie fue de 83 meses y la probabilidad de supervivencia a los 3 años se estimó en 63% descendiendo al 60% a los 5 años.

Figura 1: Supervivencia global

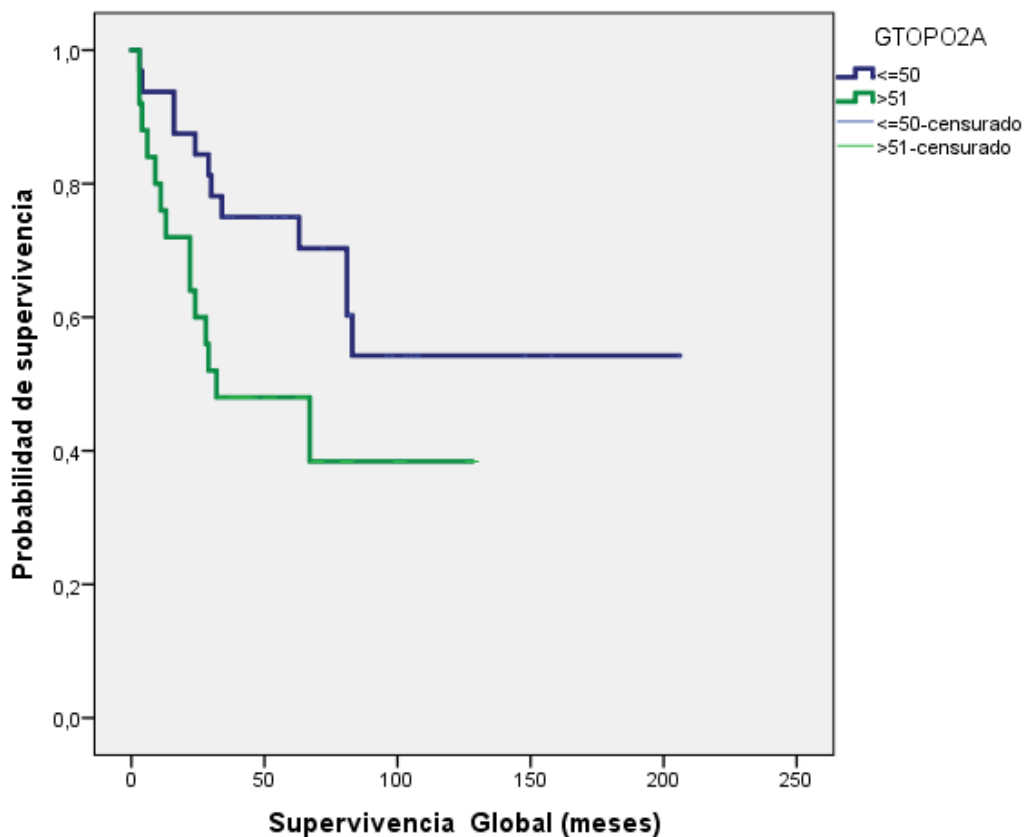


La supervivencia específica (SVE), presentó una mediana de 114 meses con una probabilidad de supervivencia a los 3 y 5 años del 66,4% (figura 2; Anexo II).

La mediana de SVG en los pacientes que sobreexpresaron TOPOIIA fue 64 meses, mientras que en los pacientes TOPOIIA negativa la supervivencia

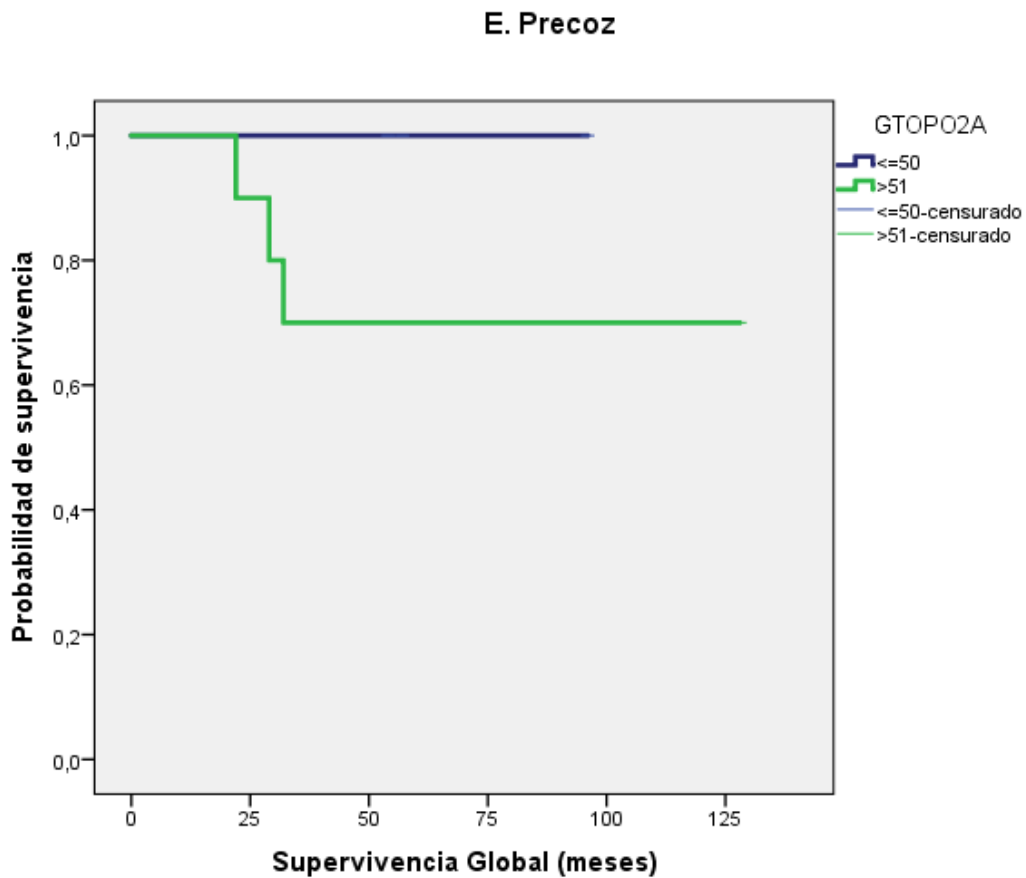
aumentó a 133 meses. Esta diferencia fue significativa según el test de Log Rank (Mantel-Cox;  $p$  0,04). Así, se observó que la supervivencia a los 3 y 5 años en los pacientes con sobreexpresión de la TOPOIIA fue del 48% para ambos casos, mientras que el grupo que no tenía sobreexpresión fue del 75%.

Figura 3: Supervivencia global/TOPOIIA



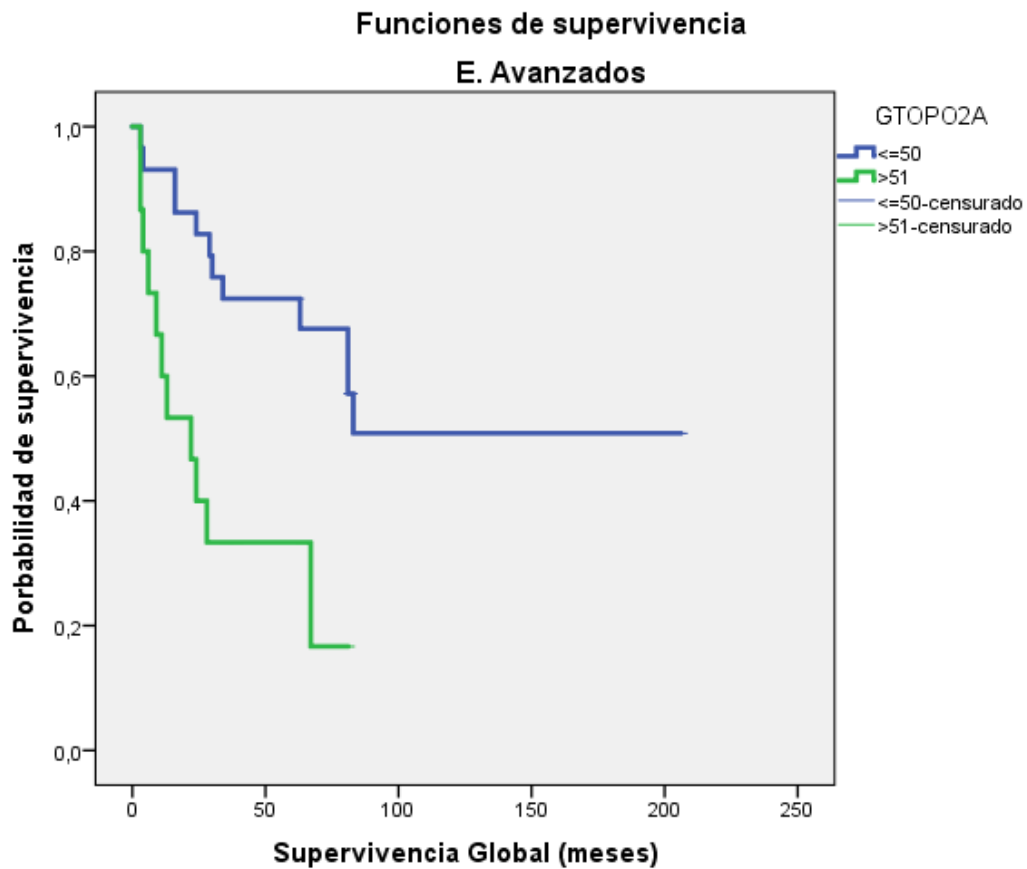
Esta SVG también fue menor en TOPOIIA positivos, tanto en el grupo con estadios precoces como en estadios avanzados, con una diferencia estadísticamente significativa ( $p$  0,001).

Figura 4: Supervivencia global en estadio precoces/TOPOIIA



Así, se observó que en estadios precoces, la supervivencia a los 3 y 5 años en el grupo que no sobreexpresaba la enzima fue del 100%, mientras que en el grupo con sobreexpresión de la TOPOIIA descendió la supervivencia al 70% tanto a los 3 como a los 5 años del seguimiento.

Figura 5: Supervivencia global en estadio avanzados/TOPOIIA

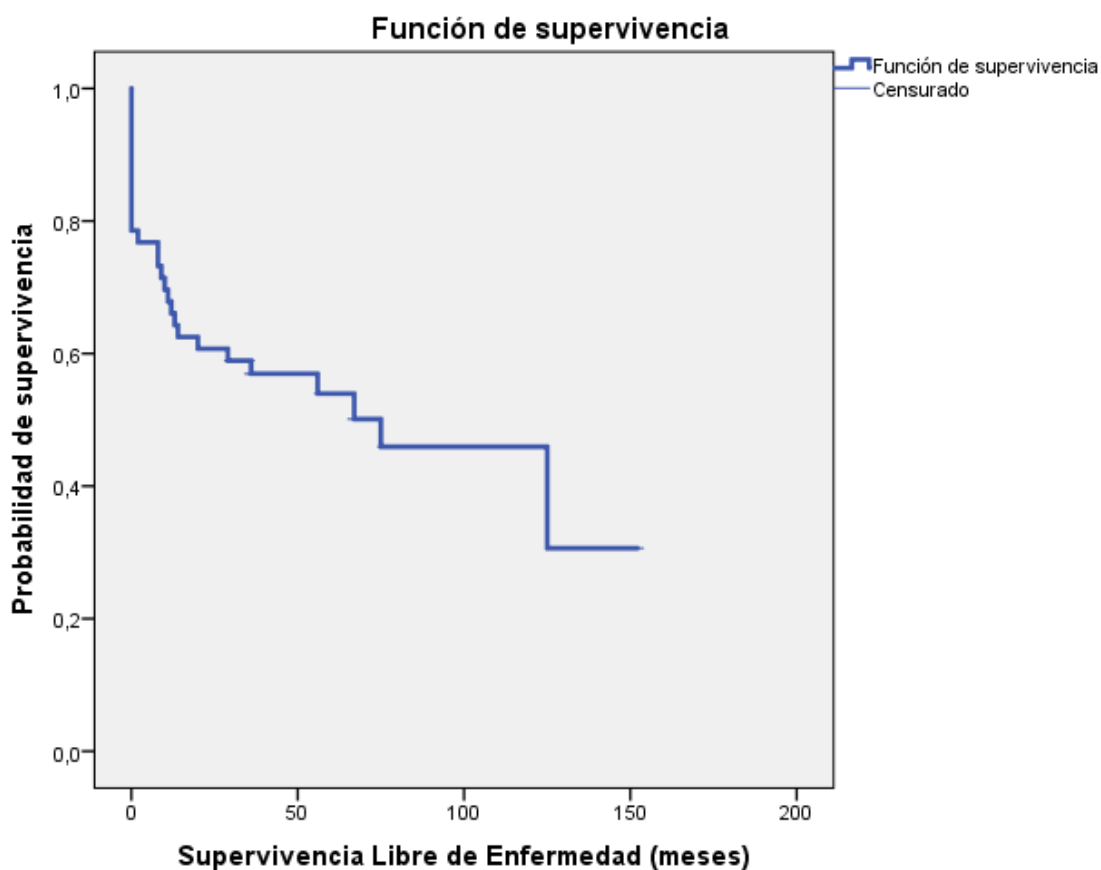


En estadios avanzados, la supervivencia a los 3 y 5 años en pacientes con sobreexpresión de la topoisomerasa fue del 33%, mientras que en el grupo que no tenía sobreexpresión fue de 72,4%.

### 2.2.2. Tiempo libre de recidiva / progresión (TLP)

La mediana de TLP de la serie fue de 76 meses, estimándose una probabilidad de estar libre de recidiva/progresión a los 3 y 5 años del 57% y 45% respectivamente.

**Figura 6:** Supervivencia libre de enfermedad

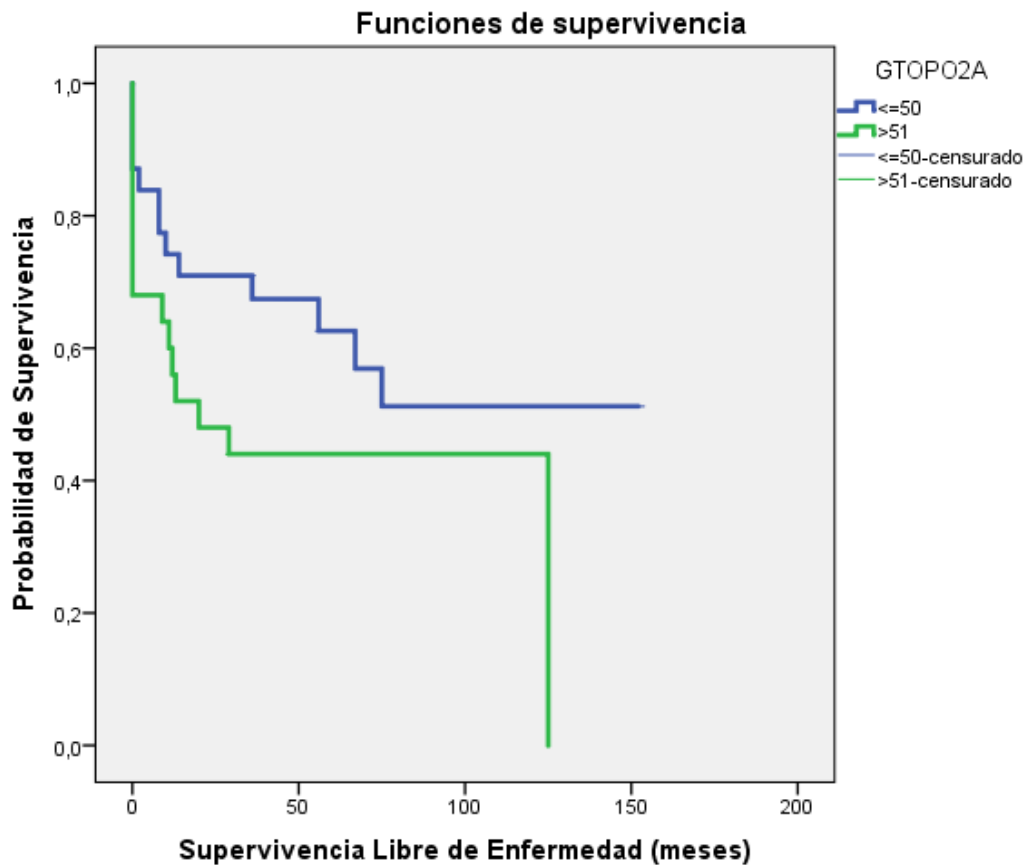


Al estudiar el TLP en relación a la expresión TOPOIIA, encontramos una mediana de supervivencia de 91 meses en las neoplasias TOPOIIA negativa, mientras que en los tumores que sobreexpresaban la enzima fue de 59 meses, pero esta diferencia mostró una tendencia hacia la significación estadística ( $p < 0,09$ ).



Divididos por grupos, la supervivencia libre de enfermedad a los 2 años fue del 51% en el grupo que no sobreexpresaba la TOPOIIA, mientras que en el grupo que sobreexpresaba la enzima fue 44%.

Figura 7: Supervivencia libre de enfermedad/TOPOIIA



### 2.2.3 Supervivencia global relacionada con la edad.

Cuando dividimos la población en dos grupos según la edad, se objetivó una diferencia estadísticamente significativa ( $p$  0,03) en cuanto a la supervivencia global entre los pacientes mayores y menores de 50 años, teniendo el grupo de menor edad una supervivencia media de 118 meses frente a 106 meses (Figura 8; Anexo II).

### 2.2.4. Supervivencia global relacionada con el género

Al analizar la supervivencia teniendo en cuenta el género de nuestros pacientes, encontramos una diferencia estadísticamente significativo ( $p$  0,02) a favor del género femenino, teniendo este una media de supervivencia de 189 meses frente a 85 meses en los varones (Figura 9; Anexo II).

### 2.2.5. Supervivencia global relacionada con el hábito tabáquico

Los pacientes fumadores tuvieron una supervivencia global menor (media de 66 meses) que los que no fumaban (media de 147). Estos resultados no fueron estadísticamente significativos ( $p$  0,13), aunque mostraron una tendencia a la significación (Figura 10, Anexo II).

### 2.2.6. Supervivencia global relacionada con las categorías TNM

Al realizar el análisis de supervivencia en función del estadio, se objetivó una mayor supervivencia sin alcanzar la significación estadística en tumores precoces (T1-T2) frente a tardíos (T3-T4), y en N precoces (N0-N1) frente a avanzados (N2-N3), sin llegar a ser estas diferencias estadísticamente significativas.

Así en T precoces la mediana de supervivencia fue de 106 meses frente a 109 meses en T avanzados con una significación estadística de 0,34 (Figura 11, Anexo II).

Por otro lado, la supervivencia global en N precoces fue de 151 meses frente a 90 meses en N avanzados (N2-N3), con una p de 0,32. Cabe destacar que hasta los 25 meses de seguimiento la distribución fue similar, encontrándonos a partir de esta fecha que los N precoces si evolucionan de manera distinta a los N avanzados (Figura 12, Anexo II).

Los 6 pacientes con metástasis fallecieron presentando una mediana de supervivencia de 24 meses, mientras la mediana de supervivencia global fue de 139 meses en el grupo sin metástasis (Figura 13, Anexo II).

### 2.2.7. Supervivencia global relacionada con Estadio

En la relación de la supervivencia global con el estadio tumoral, dividiendo la muestras en estadio precoces (I-II) y avanzados (III-IV), encontramos una tendencia a la significación estadística (p 0,077) en la diferencia de supervivencia de estadios precoces frente a avanzados (mediana de supervivencia de 112 frente a 111, Figura 14, Anexo II).

### 2.2.8. Supervivencia global relacionada con características clínico-radiológicas

Respecto a la invasión del espacio retrofaríngeo, 16 pacientes (27,6%) de nuestra muestra presentaban afectación de este espacio en el momento del diagnóstico. En el análisis de supervivencia global se halló una menor supervivencia en los paciente con invasión de este espacio con una tendencia a la significación estadística de  $p < 0,1$ , con tasas de supervivencia de 52 frente a 137 meses (Figura 15, Anexo II).

En el análisis de supervivencia global, los pacientes sin afectación de pares craneales, tuvieron una supervivencia mayor (136 y 24 meses respectivamente), con una significación estadística de  $p < 0,02$  (Figura 16, Anexo II).

En cuanto a la erosión de la base del cráneo, 15 casos presentaron erosión (25,9%). La mediana de supervivencia global fue de 44 y 144 meses en los pacientes que la presentaban frente a los que no la presentaban, con una significación de  $p < 0,01$  (Figura 17, Anexo II).

### 2.2.9. Supervivencia global relacionada con el tipo histológico: queratinizados y no queratinizados

Se distribuyeron de la siguiente forma: 12 casos de carcinoma escamoso queratinizados y 46 casos no queratinizados. La supervivencia media global fue de 46 y 132 meses respectivamente, aunque estos datos no fueron significativos ( $p < 0,1$ . Figura 18, Anexo III).

### 2.3. Análisis multivariante

Tras el análisis de las variables significativas en el estudio univariante y aquellas en las que la literatura ha catalogado como factores pronósticos independientes, puede observarse que la edad, el sexo de los pacientes, el estadio del tumor y el nivel de expresión de topoisomerasa II alfa fueron factores pronósticos independiente en relación con la supervivencia global, con hazard ratio (HR) que oscila entre 0,112 (sexo) y 4,467 (estadio).

En pacientes varones mayores de 50 años, estadios avanzados y expresión elevada de topoisomerasa II alfa, el riesgo de fallecer por la enfermedad se incrementó tal y como se observa en función de los HRs.

Tabla 24: Variables en función de la supervivencia global.

<b>Variables</b>	<b>Significación</b>	<b>HRs</b>	<b>IC 95% HR</b>
Afectación pares craneales	0,487	1,608	0,422 - 6,128
Erosión base cráneo	0,067	2,595	0,937 - 7,189
E. Retrofaringeo	0,666	0,793	0,277- 2,274
Edad	0,016	3,337	1,252 - 8,895
Sexo	0,036	0,112	0,014 - 0,865
Estadio	0,036	4,667	1,105 - 19,706
Topoisomerasa II alfa	0,022	3,270	1,185 - 9,027

## V. DISCUSIÓN

El cáncer de nasofaringe es una de las neoplasias con mejor pronóstico dentro de los tumores de Cabeza y Cuello, presentado altas tasas de control en estadios iniciales. No obstante, aunque el pronóstico de los tumores localmente avanzados ha mejorado sensiblemente con la adición de quimioterapia concurrente <sup>110, 111, 112, 113, 115</sup>, existe un subgrupo de pacientes con lesiones que no son controladas con los tratamientos disponibles actualmente.

Por otro lado, a pesar de que hoy día se conocen los principales mecanismos implicados en la carcinogénesis de estos tumores, el tratamiento sigue realizándose en base a factores pronósticos clínico-patológicos. Sin embargo, se sabe que tumores de Cabeza y Cuello con estadio similar presentan respuestas al tratamiento y pronósticos diferentes. Por ello, en la búsqueda de un tratamiento más individualizado y eficaz de esta patología, en los últimos años distintos estudios han tratado de identificar biomarcadores que permitan predecir con mayor precisión el pronóstico de la enfermedad, e identificar dianas terapéuticas para el diseño de nuevos fármacos biológicos <sup>177, 178</sup>. Hasta la fecha, no se ha identificado ningún biomarcador pronóstico aplicable a la práctica clínica. Por los motivos citados, en este análisis retrospectivo con pacientes tratados en el Hospital Universitario “Virgen de la Victoria”, hemos investigado el papel de la topoisomerasa II alfa como factor pronóstico en el cáncer de nasofaringe.

En nuestro estudio, la edad media de diagnóstico del carcinoma nasofaríngeo fue de 52 años, coincidiendo con otras series españolas <sup>286</sup>. Sin embargo, esta edad media es menor que la reportada por otras series descritas en la literatura referentes a áreas de bajo riesgo de presentación, donde la incidencia se incrementó con la edad hasta un pico de 60-69 años , a diferencia de áreas de

alto riesgo donde la incidencia máxima se observó en la cuarta década <sup>2, 287</sup>. En cuanto al género, la relación hombre/mujer en nuestro estudio presentó un ratio de 5 a favor de los hombres, siendo más alta que en la descrita en la bibliografía disponible <sup>288</sup>.

Si bien la entidad histológica más frecuente en nuestra serie fue la de carcinoma indiferenciado, encontramos un importante porcentaje de carcinomas escamosos queratinizantes (20%). Estos datos se aproximan a los descritos por Escamilla y cols., con una incidencia de un 26% <sup>289</sup>, y difieren de los reportados en otros países como Portugal donde los resultados son más similares a los encontrados en China, con un reducido porcentaje de carcinomas escamosos queratinizantes <sup>290</sup>.

En lo que respecta al estadio, el 77% de los casos de nuestro estudio se diagnosticaron en un estadio avanzado, presentando un 34% de los casos un estadio III y un 43% un estadio IV. Asimismo, el 67% de los tumores se presentaron con adenopatías regionales al diagnóstico. Estos resultados coinciden con otras series nacionales <sup>289</sup>, y puede tener relación con la vaga sintomatología de la enfermedad en sus fases iniciales <sup>291</sup>.

Las supervivencias descritas en la literatura en el cáncer de nasofaringe se sitúan en torno al 80-90% para estadios I, el 65-86% para estadios II, el 45-61% para estadios III y el 30-48% para estadios IV <sup>109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 287</sup>.

En nuestra serie no se ha realizado estudio de supervivencia por estadios debido al pequeño número de casos, pero globalmente y en los subgrupos analizados (estadios precoces y estadios avanzados), podemos considerarlas similares a la bibliografía, con una supervivencia global para estadios precoces



de un 84% y una supervivencia global para estadios avanzados del 65% a 5 años. En cuanto a la supervivencia relacionada con el tipo histológico no hay diferencias estadísticas significativas, pero en el análisis de las curvas se observó en los primeros 24 meses una evolución más rápida de la enfermedad, y más casos de exitus, en los tumores queratinizantes, igualándose a partir de esta fecha con los no queratinizantes.

Es necesario señalar que nuestra muestra incluye diferentes protocolos terapéuticos durante un largo periodo de tiempo, lo cual dificulta la comparación de los resultados con los descritos en otros estudios.

Las topoisomerasas son enzimas capaces de actuar sobre la topología del ADN, ya sea compactándolo o descompactándolo en función de las necesidades de replicación celular. Por ello, estas enzimas son necesarias dados los problemas inherentes a la configuración estructural del ADN.

El ADN posee una estructura en forma de doble hélice en la cual dos hebras se encuentran enrolladas una sobre la otra, esta estructura permite conservar de manera estable el material genético. Con la finalidad de solventar los problemas causados por esta configuración de doble hélice, las topoisomerasas son capaces de cortar y pegar ya sea una o dos de las hebras del esqueleto del ADN. Esta rotura selectiva permite al ADN descompactarse y desenrollarse para posibilitar el acceso de otras enzimas a la información contenida en su interior e iniciar el proceso de replicación. Al final del proceso, el ADN es restaurado a su configuración inicial. La replicación de ADN es un mecanismo esencial utilizado por las células altamente proliferativas en su división, y por lo tanto, la topoisomerasa es una proteína fundamental para que se realice correctamente.

Distintos estudios han mostrado incrementos importantes en la expresión de TOPOIIA en diferentes patologías como el adenocarcinoma de mama <sup>268</sup>, carcinoma no microcítico de pulmón <sup>275</sup>, adenocarcinoma de colon <sup>276</sup>, hepatocarcinoma <sup>277</sup> y sarcomas <sup>378</sup>, motivo por el cual distintos autores han señalado la posible implicación de esta proteína en la carcinogénesis <sup>292</sup>.

En lo que respecta al cáncer de nasofaringe, existe únicamente una publicación que analizó el valor pronóstico de la sobreexpresión de TOPOIIA en este tumor. Por ello, se realizó este estudio retrospectivo que tiene como objetivo analizar el valor pronóstico de la TOPOIIA en el cáncer de nasofaringe en los pacientes tratados en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria.

La tasa de sobreexpresión de TOPOIIA en nuestro estudio fue del 44,8%, siendo similar a la serie de Lan y cols. que reportaron sobreexpresión de la misma en el 50% de una serie de 124 pacientes afectados de carcinoma de nasofaringe en estadios precoces y avanzados, distribuyéndose de manera similar a nuestra serie <sup>284</sup>.

En cuanto a la relación entre la expresión de TOPOIIA y otros factores pronósticos clínicos, se objetivó una asociación entre la falta de expresión de la enzima y categorías T y N más avanzadas (p 0,04 y p 0,052 respectivamente). Del mismo modo, se encontró una diferencia significativa (p 0,008) entre la expresión de TOPOIIA en tumores precoces (estadios I y II) en comparación con avanzados (III y IV), hallando sobreexpresión en los estadios precoces. Estos resultados no coinciden con los de Lan et al, que objetivaron una mayor expresión en estadios avanzados (p 0,019) y en categorías T y N avanzadas, aunque estas últimas diferencias no alcanzaron la significación estadística (p 0,13 y p 0,14 respectivamente) <sup>284</sup>.

Aunque la menor expresión de TOPOIIA en tumores más avanzados no ha sido descrita previamente, los hallazgos descritos pueden explicarse por la inestabilidad genética asociada a la progresión tumoral. Se conoce que los tumores esporádicos se originan y progresan tras la acumulación de distintas mutaciones en genes que se ocupan de mantener la integridad genómica celular <sup>293</sup>. Así, las alteraciones en distintos genes supresores de tumores y de distintas aberraciones cromosómicas, producidas de manera más acusada en tumores avanzados, se asocian a la pérdida en la expresión de genes afectados por dicho proceso <sup>294</sup>. De este modo, a medida que el tumor crece se producen mayores alteraciones genéticas que pueden condicionar la expresión de determinados genes afectados por dichas modificaciones.

Con respecto a los resultados, la SVG y TLE de los pacientes con tumores que expresaban TOPOIIA fue menor que los que no la expresaban, con medianas de SVG de 64 meses frente a 133 meses (p 0,04), y medianas de TLE de 59 meses frente a 91 meses (p 0,09). Estos resultados se mantuvieron cuando el análisis se realizó por separado en tumores precoces frente a tumores avanzados. Además con el análisis multivariante se confirmó el valor pronóstico independiente negativo de la expresión de la TOPOIIA frente a la no expresión (p 0,022). Estos hallazgos coinciden con los de Lain y cols, que mostraron una relación significativa entre la positividad para TOPOIIA y una menor supervivencia, con medianas de 21 meses en casos de presencia de TOPOIIA frente a 38 meses en casos de ausencia de expresión (p 0,0078) <sup>284</sup>. Estos autores también objetivaron una mayor supervivencia libre de metástasis a distancia en los pacientes con tumores que no expresaban TOPOIIA (p 0,0003) <sup>284</sup>. Considerando las probables implicaciones de la enzima topoisomerasa en

la reparación celular tras daño radioinducido, estos hallazgos podrían explicarse por una mayor capacidad de reparación del daño producido al ADN por la radioterapia y quimioterapia en aquellos tumores que expresan TOPOIIA, disminuyendo la eficacia de dichos tratamientos en comparación a los tumores que no expresan la enzima <sup>295</sup>.

Nuestro trabajo tiene limitaciones derivadas de la ausencia actual de unos métodos estandarizados en la medición de la expresión inmunohistoquímica de la TOPOIIA, la variedad de tratamientos en el largo período de tiempo analizado, y los sesgos inherentes a un estudio retrospectivo. Sin embargo, hay que destacar que se trata de una serie sólida dado que todos los pacientes están tratados de forma homogénea en el mismo centro y se ha llevado a cabo un largo y meticuloso seguimiento.

Aunque estos resultados deben tomarse con cautela por las circunstancias mencionadas y la escasez de estudios disponibles, los datos analizados apuntan a que la expresión de TOPOIIA podría ser un biomarcador pronóstico útil en el cáncer de nasofaringe. Este biomarcador permitiría identificar a los pacientes de peor pronóstico, fundamentalmente dentro de los estadios más avanzados, con vistas a la investigación de tratamientos más agresivos para mejorar el pronóstico. Estos hallazgos justifican el estudio de este biomarcador de manera prospectiva dentro de un ensayo clínico.

## VI. CONCLUSIONES

Conclusiones del objetivo Principal

La topoisomerasa II alfa es un factor pronóstico de supervivencia en los pacientes con cáncer de nasofaringe tratados en el Hospital Universitario Virgen de la Victoria.

Conclusiones de los objetivos secundarios

- 1.- Los carcinomas de nasofaringe presentaron sobreexpresión de la enzima topoisomerasa II alfa en un porcentaje alto de casos (44,8% de los pacientes).
- 2.- La expresión de topoisomerasa aumentó en estadios precoces, tanto del tumor como de los ganglios linfáticos, con porcentajes de expresión del 76,9% en tumores precoces y 35,6% en tumores avanzados.
- 3.- No se identificaron asociaciones entre la expresión de topoisomerasa y otros factores pronósticos tales como la histología, diferenciación tumoral, invasión del espacio retrofaríngeo, afectación de pares craneales, y erosión de base de cráneo.
- 4.- La expresión de la topoisomerasa se asoció significativamente a la respuesta al tratamiento, objetivándose sobreexpresión de la misma en el 100% de casos con estabilización o progresión frente a un 40% en respuesta completa (p 0,02).

5.- La sobreexpresión de topoisomerasa se correlacionó de manera significativa con una peor supervivencia global de los pacientes.

6.- La edad, sexo, estadio y expresión de topoisomerasa resultaron ser factores pronósticos independientes de supervivencia en nuestro estudio.

## VII. BIBLIOGRAFÍA



1. Spratt DE, Lee N. Current and emerging treatment options for nasopharyngeal carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2012; 5: 297–308.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015; 136 (5):359-386.
3. Alcade J, Basterra J, Rey J, Ruda D, Bonet M. Concepto, clasificación y estadificación. *Epidemiología. Anatomía Patológica macroscópica y vías de extensión.* En: Basterra Alegría J, coordinador. *Carcinomas de la faringe.* Ponencia Oficial SEORL. Badalona: Ediciones Médicas S.L; 2007. p. 61-66.
4. Yoshizaki T; Ito ; Muro S; Wakisaka, N; Kondo S; Endo K. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2012; 39(2): 137-144.
5. Wei WI, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet.* 2005; 365:2041–2054.
6. Chan CW, Nicholls JM, Sham JST, Dickens P, Choy D. Nasopharyngeal carcinoma in situ in nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Pathol.* 1992; 45: 898–901.
7. Pathmanathan R, Prasad U, Sadler R, Flynn K, Raab-Traub N. Clonal proliferations of cells infected with Epstein–Barr virus in preinvasive lesions related to nasopharyngeal carcinoma. *N Engl J Med.* 1995; 333:693–698.

8. Lee JCK. Precancerous changes. En: Van Hasselt CA, editor. Nasopharyngeal carcinoma. 1ª ed. Hong Kong: Chinese University Press; 1991. p. 37–45.
9. Sheu LF, Chen A, Meng CL, Ho KC, Lin FG, Lee WH. Analysis of bcl-2 expression in normal, inflamed, dysplastic nasopharyngeal epithelia, and nasopharyngeal carcinoma: association with p53 expression. *Hum Pathol.* 1996; 28 (5): 556–562.
10. Tan KB, Putti TC. Cyclooxygenase 2 expression in nasopharyngeal carcinoma: immunohistochemical findings and potential implications. *J Clin Pathol.* 2005; 58: 535–538.
11. Pak MW, To KF, Lo YM, Chan LY, Tong JH, Lo KW, et al. Nasopharyngeal carcinoma in situ (NPCIS)-pathologic and clinical perspectives. *Head Neck.* 2002; 24:989–995
12. Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.): World Health Organization Classification of tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon 2005.
13. Shanmugaratnam K, Chan SH, de-Thé G, Goh JE, Khor TH, Simons, et al. Histopathology of nasopharyngeal carcinoma: correlations with epidemiology, survival rates and other biological characteristics. *Cancer.* 1979; 44(3):1029–1044.
14. Shedd DP, von Essen CF, Eisenberg H. Cancer of the nasopharynx in Connecticut, 1935 through 1959. *Cancer.* 1967; 20:508–511.
15. González Serrano MT. Aproximación al Estudio Biomolecular del Carcinoma Nasofaríngeo. Universidad de Sevilla. 2010

16. Banks ER, Frierson HFJ, Mills SE, George E, Zarbo RJ, Swanson PE. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 40 cases. *Am J Surg Pathol.* 1992; 16: 939-946.
17. Wain SL, Kier R, Vollmer RT, Bossen EH. Basaloid-squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx: report of 10 cases. *Hum Pathol.* 1986; 17: 1158- 1166
18. Barnes L, Ferlito A, Altavilla G, MacMillan C, Rinaldo A, Doglioni C. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: clinicopathological features and differential diagnosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1996; 105: 75-82.
19. Ereno C, López JI, Sanchez JM, Toledo JD. Basaloid-squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. A clinicopathologic study of 7 cases. *Pathol Res Pract.* 1994; 190: 186-193.
20. Nojeg MM, Jalaludin MA, Jayalakshmi P. Papillary adenocarcinoma of the nasopharynx—case report and review of the literature. *Med J Malaysia.* 1998; 53(1):104-106.
21. van Hasselt CA, Ng HK. Papillary adenocarcinoma of the nasopharynx. *J LaryngolOtol.* 1991; 105: 853-854.
22. Wenig BM, Hyams VJ, Heffner DK. Nasopharyngeal papillary adenocarcinoma. A clinicopathologic study of a low-grade carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1988; 12: 946-953.
23. Spiro JD, Soo KC, Spiro RH. Non squamous cell malignant neoplasms of the nasal cavities and paranasal sinuses. *Head Neck.* 1995; 17: 114-118

24. Kuo T, Tsang NM. Salivary gland type nasopharyngeal carcinoma: a histologic, immunohistochemical, and Epstein-Barr virus study of 15 cases including a psammomatous mucoepidermoid carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25: 80-86
25. Schramm VL Jr, Imola MJ. Management of nasopharyngeal salivary gland malignancy. *Laryngoscope.* 2001; 111: 1533- 1544
26. Wang CC, See LC, Hong JH, Tang SG. Nasopharyngeal adenoid cystic carcinoma: five new cases and a literature review. *J Otolaryngol.* 1996; 25: 399-403
27. Imate Y, Yamashita H, Endo S, Okami K, Kamada T, Takahashi M, Kawano H. Epithelial-myoeplithelial carcinoma of the nasopharynx. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2000; 62: 282-285
28. Nilles R, Lenarz T, Kaiserling E. Myoeplithelial carcinoma of the nasopharynx. Case report and review of the literature. *HNO.* 1993; 41: 396-400
29. Nicolai P, Redaelli de Zinis LO, Tomenzoli D, Maroldi R, Antonelli AR. Sphenoid mucocele with intracranial invasion secondary to nasopharyngeal acinic cell carcinoma. *Head Neck.* 1991; 13: 540- 544.
30. Wenig BM, Harpaz N, DelBridge C. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of seromucous glands of the nasopharynx. A report of a case and a discussion of the morphologic and immunohistochemical features. *Am J Clin Pathol.* 1989; 92: 104-109.
31. Chan AT, Teo PM, Johnson PJ. Nasopharyngeal carcinoma. *Ann Oncol.* 2002; 13(7):1007–1015.

32. Jia WH, Feng BJ, Xu ZL, Zhang XS, Huang P, Huang LX, et al. Familial risk and clustering of nasopharyngeal carcinoma in Guangdong, China. *Cancer*. 2004; 101(2):363–369.
33. Zeng YX, Jia WH. Familial nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12(6):443–450
34. Levine PH, Pocinki AG, Madigan P, et al. Familial nasopharyngeal carcinoma in patients who are not Chinese. *Cancer*. 1992; 70(5):1024–1029.
35. Suarez C, Rodrigo JP, Ferlito A, Cabanillas R, Shaha AR, Rinaldo A, et al. Tumours of familial origin in the head and neck. *Oral Oncol*. 2006; 42(10):965–978
36. Friberg J, Wohlfahrt J, Koch A, Storm H, Olsen OR, Melbye M. Cancer susceptibility in nasopharyngeal carcinoma families – a population based cohort study. *Cancer Res*. 2005; 65(18):8567–8572.
37. Burt RD, Vaughan TL, McKnight B, et al. Associations between human leukocyte antigen type and nasopharyngeal carcinoma in Caucasians in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1996; 5(11): 879-87.
38. Hildesheim A, Apple RJ, Chen CJ, Wang SS, Cheng YJ, Klitz W, Mack SJ, et al. Association of HLA class I and II alleles and extended haplotypes with nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst*. 2002; 94(23):1780–1789.
39. Liebowitz D. Nasopharyngeal carcinoma: the Epstein–Barr virus association. *Semin Oncol*. 1994; 21(3):376–381.

40. Shih-Hsin Wu L. Construction of evolutionary tree models for nasopharyngeal carcinoma using comparative genomic hybridization data. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 168(2):105–108.
41. Tjia WM, Sham JS, Hu L, Tai ALS, Guan XY. Characterization of 3p, 5p, and 3q in two nasopharyngeal carcinoma cell lines, using region-specific multiplex fluorescence in situ hybridization probes. *Cancer Genet Cytogenet.* 2005; 158(1):61–66.
42. Lo K, Huang PW, Lee CK. Genetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *Chin Med J.* 1997; 110(7):548–549.
43. Hui AB, Lo KW, Leung SF, Teo P, Fung MK, To KF, et al. Detection of recurrent chromosomal gains and losses in primary nasopharyngeal carcinoma by comparative genomic hybridisation. *Int J Cancer.* 1999; 82(4):498–503.
44. Lo KW, Teo PM, Hui AB, To KF, Tsang YS, Chan SY, et al. High resolution allele type of microdissected primary nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2000; 60(13):3348–3353.
45. Xiong W, Zeng ZY, Xia JH, Xia K, Sheng SR, Li XL, et al. A susceptibility locus at chromosome 3p21 linked to familial nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2004; 64(6):1972–1974.
46. Deng L, Jing N, Tan G, Zhou M, Zhan F, Xie Y, et al. A common region of allelic loss on chromosome region 3p25.3–26.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998; 23(1): 21–25.
47. Hildesheim A, Anderson LM, Chen CJ, Cheng YJ, Brinton LA, Daly AK, et al. CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J Natl Cancer Inst.* 1997; 89(16):1207–1212.

48. Hildesheim A, Chen CJ, Caporaso NE, Cheng YJ, Brinton LA, Daly AK, et al. Cytochrome P450E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma: results from a case-control study conducted in Taiwan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1995; 4(6):607–610.
49. Nazar-Stewart V, Vaughan TL, Burt RD, Chen C, Berwick M, Swanson GM. Glutathione S-transferase M1 and susceptibility to nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999; 8(6):547–551.
50. Cho EY, Hildesheim A, Chen CJ, Hsu MM, Chen IH, Mittl BF, et al. Nasopharyngeal carcinoma and genetic polymorphisms of DNA repair enzymes XRCC1 and hOGG1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003; 12(10):1100–1104.
51. Armstrong RW, Imrey PB, Lye MS, Armstrong MJ, Yu MC, Sani S, et al (1998) Nasopharyngeal carcinoma in Malaysian Chinese: salted fish and other dietary exposures. *Int J Cancer.* 1998; 77(2):228–235.
52. Ning JP, Yu MC, Wang QS, Henderson BE. Consumption of salted fish and other risk factors for nasopharyngeal carcinoma (NPC) in Tianjin, a low-risk region for NPC in the People's Republic of China. *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82(4):291–296.
53. Sriamporn S, Vatanasapt V, Pisani P, Yongchaiyudha S, Rungpitarangsri V. Environmental risk factors for nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in northeastern Thailand. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1992; 1(5):345–348.
54. Yu MC, Mo CC, Chong WX, Yeh FS, Henderson BE. Preserved foods and nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Guangxi, China. *Cancer Res.* 1988; 48(7):1954–1959.

55. Yuan JM, Wang XL, Xiang YB, Gao YT, Ross RK, Yu MC. Preserved foods in relation to risk of nasopharyngeal carcinoma in Shanghai, China. *Int J Cancer*. 2000; 85(3):358–363.
56. Yu MC, Yuan JM. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12(6):421–429.
57. Guo X, Johnson RC, Deng H, Liao J, Li Guan L, Nelson GW, et al. Evaluation of nonviral risk factors for nasopharyngeal carcinoma in a high-risk population of Southern China. *Int J Cancer*. 2009; 124(12): 2942–2947.
58. Partanen T. Formaldehyde exposure and respiratory cancer –a metaanalysis of the epidemiologic evidence. *Scand J Work Environ Health*. 1993; 19(1):8-15.
59. Old LJ, Boyse EA, Oettgen HF, De Harven E, Geering G, Williamson B, et al. Precipitating antibody in human serum to an antigen present in cultured burkitt's lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966; 56(6): 1699–1704.
60. Baumforth KR, Young LS, Flavell KJ, Constandinou C, Murray PG. The Epstein–Barr virus and its association with human cancers. *Mol Pathol*. 1999; 52(6):307–322.
61. Shao YM, Poirier S, Ohshima H, Malaveille C, Zeng Y, de Thé G, et al. Epstein–Barr virus activation in Raji cells by extracts of preserved food from high risk areas for nasopharyngeal carcinoma. *Carcinogenesis*. 1988; 9(8):1455–1457.
62. Cohen JL. Epstein–Barr virus infection. *N Engl J Med*. 2000; 343:481–492.



63. Chien YC, Chen JY, Liu MY, Yang HI, Hsu MM, Chen CJ. Serologic markers of Epstein–Barr virus infection and nasopharyngeal carcinoma in Taiwanese men. *N Engl J Med.* 2001; 27; 345(26):1877-1882.
64. Lo AK, Huang DP, Lo KW, Chui YL, Li HM, Pang JC, et al. Phenotypic alterations induced by the Hong Kong-prevalent Epstein–Barr virus encoded LMP1 variant (2117-LMP1) in nasopharyngeal epithelial cells. *Int J Cancer.* 2004; 109(6):919–925.
65. 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(2):171–179.
66. Raab-Traub N, Flynn K. The structure of the termini of the Epstein–Barr virus as a marker of clonal cellular proliferation. *Cell.* 1986; 47(6):883–889.
67. Niedobitek G. Epstein–Barr virus infection in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Mol Pathol.* 2000; 53(5): 248–254.
68. Weiss LM, Movahed LA, Butler AE, Swanson SA, Frierson HF Jr, Cooper PH, et al. Analysis of lymphoepithelioma and lymphoepithelioma-like carcinomas for Epstein–Barr viral genomes by in situ hybridization. *Am J Surg Pathol.* 1989; 13(8):625–631.
69. Wan J, Sun L, Mendoza JW, Chui YL, Huang DP, Chen ZJ, et al. Elucidation of the c-Jun N-terminal kinase pathway mediated by Epstein–Barr virus encoded latent membrane protein 1. *Mol Cell Biol.* 2004; 24(1): 192–199.

70. Baer R, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, et al (1984) DNA sequence and expression of the B95–8 Epstein–Barr virus genome. *Nature*. 1984; 310(5974):207–211.
71. Raab-Traub N. Epstein–Barr virus in the pathogenesis of NPC. *Semin Cancer Biol*. 2002; 12:431–441.
72. Babcock GJ, Decker LL, Volk M, Thorley-Lawson DA. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity*. 1998; 9(3):395–404.
73. Tao Q, Srivastava G, Chan AC, Chung LP, Loke SL, Ho FC. Evidence for lytic infection by Epstein–Barr virus in mucosal lymphocytes instead of nasopharyngeal epithelial cells in normal individuals. *J Med Virol*. 1995; 45(1):71–77.
74. Niedobitek G, Agathangelou A, Nicholls JM. Epstein–Barr virus infection and the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma: viral gene expression, tumour cell phenotype, and the role of the lymphoid stroma. *Semin Cancer Biol*. 1996; 7(4):165–174.
75. Nemerow GR, Mold C, Schwend VK, Tollefson V, Cooper NR. Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein–Barr virus (EBV) to the EBV//C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol*. 1987; 61(5):1416–1420.
76. Borza CM, Hutt-Fletcher LM. Alternate replication in B cells and epithelial cells switches tropism of Epstein–Barr virus. *Nat med*. 2002; 8(6):594–599.
77. Rickinson A. Epstein–Barr virus. *Virus Res*. 2002; 82(1–2):109–113

78. Rowe M. Cell transformation induced by Epstein–Barr virus – living dangerously. *Semin Cancer Biology*. 2001; 11(6): 403–405.
79. Roy NS, Nakano T, Keyoung HM, Windrem M, Rashbaum WK, Alonso ML, et al. Telomerase immortalization of neuronally restricted progenitor cells derived from the human fetal spinal cord. *Nat Biotechnol*. 2004; 22(3):297–305.
80. Smith P. Epstein–Barr virus complementary strand transcripts (CSTs//BARTs) and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2001; 11(6):469–476.
81. Bargou RC, Emmerich F, Krappmann D, Bommert K, Mapara MY, Arnold W et al. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest*. 1997; 100(12):2961–2969.
82. He Z, Xin B, Yang X, Chan C, Cao L. Nuclear factor-kappaB activation is involved in LMP1-mediated transformation and tumorigenesis of rat-1 fibroblasts. *Cancer Res*. 2000; 60(7):1845–1848.
83. Hoppe RI, Goffinet DR, Bagshaw MA. Carcinoma of the nasopharynx. Eighteen years experience with megavoltage radiation therapy. *Cancer*. 1976; 37:2605–2612.
84. Mesic JB, Fletcher GH, Goepfert H. Megavoltage irradiation of epithelial tumors of the nasopharynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1981; 7:447–453.
85. Perez CA, Ackerman LV, Mill WB, Ogura JH, Powers WE. Cancer of the nasopharynx. Factors influencing prognosis. *Cancer*. 1969; 24:1–17.

86. Cooper JS, Del Rowe J, Newall J. Regional stage IV carcinoma of the nasopharynx treated by aggressive radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1983; 9:1737–1745.
87. Ahmad A, Stefani S. Distant metastases of nasopharyngeal carcinoma: a study of 256 male patients. *J Surg Oncol.* 1986; 33:184–197.
88. Dimery IW, Legha SS, Peters LJ, Goepfert H, Oswald MJ. Adjuvant chemotherapy for advanced nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 1979; 60:943–949.
89. Baujat B, Audry H, Bourhis J, Chan AT, Onat H, Chua DT, et al. Chemotherapy as an adjunct to radiotherapy in locally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev.* 2006; (4): 4329.
90. Xia P, Fu KK, Wong GW, Akazawa C, Verhey LJ. Comparison of treatment plans involving intensity-modulated radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2000; 48: 329–337.
91. Kam MK, Chau RM, Suen J, Choi PH, Teo PM. Intensity-modulated radiotherapy in nasopharyngeal carcinoma: dosimetric advantage over conventional plans and feasibility of dose escalation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003; 56: 145–157.
92. Hunt MA, Zelefsky MJ, Wolden S, Chui CS, LoSasso T, Rosenzweig K, et al. Treatment planning and delivery of intensity-modulated radiation therapy for primary nasopharynx cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 49: 623–632.

93. Wolden SL, Chen WC, Pfister DG, Kraus DH, Berry SL, Zelefsky MJ. Intensity-modulated radiation therapy (IMRT) for nasopharynx cancer: update of the Memorial Sloan-Kettering experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 64: 57–62.
94. Lee N, Xia P, Quivey JM, et al. Intensity-modulated radiotherapy in the treatment of nasopharyngeal carcinoma: an update of the UCSF experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002; 53: 12–22.
95. Pow EH, Kwong DL, McMillan AS, Wong MC, Sham JS, Leung LH, et al. Xerostomia and quality of life after intensity-modulated radiotherapy vs conventional radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: initial report on a randomized controlled clinical trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 66: 981–991.
96. Kwong DL, Pow EH, Sham JS, McMillan AS, Leung LH, Leung WK, et al. Intensity modulated radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: a prospective study on disease control and preservation of salivary function. *Cancer.* 2004; 101: 1584–1593.
97. Lee N, Harris J, Garden AS, Straube W, Glisson B, Xia P, et al. Intensity-modulated radiation therapy with or without chemotherapy for nasopharyngeal carcinoma: radiation therapy oncology group phase II trial 0225. *J Clin Oncol.* 2009; 27: 3684–3690.
98. Al-Kourainy K, Crissman J, Ensley J, Kish, J., Kelly, J. Excellent response to cisplatin-based chemotherapy in patients with recurrent or previously untreated advanced nasopharyngeal carcinoma. *Am J Clin Oncol.* 1988; 11: 427–430.

99. Choo R, Tannock I. Chemotherapy for recurrent or metastatic carcinoma of the nasopharynx; a review of the Princess Margaret Hospital experience. *Cancer*. 1991; 68:2120–2124.
100. Decker DA, Drelichman A, Al-Sarraf M, Crissman J, Reed ML. Chemotherapy for nasopharyngeal carcinoma. A 10 year experience. *Cancer*. 1983; 52:602–605.
101. Richmond RC, Zimbrick JD, Hykes DL. Radiation induced DNA damage and lethality in *E coli* as modified by the antitumor agent cis-dichlorodiammineplatinum (II). *Radiat Res*. 1977; 71:447–460.
102. Douple EB, Richmond RC, Logan ME. Therapeutic potentiation in a mouse mammary tumor and an intracerebral rat brain tumor by combined treatment with cis-dichlorodiammineplatinum (II) and radiation. *J Clin Hematol Oncol*. 1977; 7:585–603.
103. Soloway MS, Morris CR, Sudderth B. Radiation therapy and cis-diamminedichloroplatinum (II) in transplantable and primary murine bladder cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1979; 5:1355–1360.
104. Szumiel I, Nias AHW. The effect of combined treatment with a platinum complex and ionizing radiation on Chinese hamster ovary cells in vitro. *Br J Cancer*. 1976; 33:450–458.
105. Al-Sarraf M, Pajak TF, Cooper JS, Mohiuddin M, Herskovic A, Ager PJ. Chemoradiotherapy in patients with locally advanced nasopharyngeal carcinoma: a Radiation Therapy Oncology Group Study. *J Clin Oncol*: 1990; 8(8):1342–1351.
106. Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG, Fu KK, Cooper J, Vuong T, et al. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced

- nasopharyngeal cancer: phase III randomized Intergroup study 0099. *J Clin Oncol.* 1998; 16(4):1310–1317.
107. Xiao WW, Han F, Chen CY, Huang Y, Zhao C. Treatment outcomes after radiotherapy alone for patients with early-stage nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2009; 74:1070–1076.
108. Chua DT, Sham JS, Au GK. Treatment outcome after radiotherapy alone for patients with Stage I-II nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 2003; 98(1):74–80.
109. Chua DT, Sham JS, Kwong PW, Hung KN, Leung LHT. Linear accelerator-based stereotactic radiosurgery for limited, locally persistent, and recurrent nasopharyngeal carcinoma: efficacy and complications. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2003; 56(1):177–183.
110. Wee J, Tan EH, Tai BC, Wong HB, Leong SS, Tan T, et al. Randomized trial of radiotherapy versus concurrent chemoradiotherapy followed by adjuvant chemotherapy in patients with American Joint Committee on Cancer/International Union against cancer stage III and IV nasopharyngeal cancer of the endemic variety. *J Clin Oncol.* 2005; 23(27): 6730–6738.
111. Lee AW, Lau WH, Tung SY, Chua DT, Chappell R, Xu L, et al. Preliminary results of a randomized study on therapeutic gain by concurrent chemotherapy for regionally-advanced nasopharyngeal carcinoma: NPC-9901 Trial by the Hong Kong Nasopharyngeal Cancer Study Group. *J Clin Oncol.* 2005; 23(28): 6966–6975.
112. Lee AW, Sze WM, Au JS, Leung SF, Leung TW, Chua DT, et al. Treatment results for nasopharyngeal carcinoma in the modern era: the

- Hong Kong experience. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005; 61(4): 1107–1116.
113. Lee AW, Tung SY, Chan AT, Chappell R, Fu YT, Lu TX, et al. Preliminary results of a randomized study (NPC-9902 trial) on therapeutic gain by concurrent chemotherapy and/or accelerated fractionation for locally advanced nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006; 66(1):142–151.
114. Overgaard J, Hansen HS, Specht L, Overgaard M, Grau C, Andersen E, et al. Five compared with six fractions per week of conventional radiotherapy of squamous cell carcinoma of head and neck: DAHANCA 6 and 7 randomized controlled trial. *Lancet.* 2003; 362:933–940.
115. Chen Y, Liu MZ, Liang SB, Zong JF, Mao YP, Tang LL, et al. Preliminary results of a prospective randomized trial comparing concurrent chemoradiotherapy plus adjuvant chemotherapy with radiotherapy alone in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma in endemic regions of China. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 71(5):1356–1364.
116. Rossi A, Molinari R, Boracchi P, Del Vecchio M, Marubini E, Nava M, et al. Adjuvant chemotherapy with vincristine, cyclophosphamide, and doxorubicin after radiotherapy in local-regional nasopharyngeal cancer: results of a 4-year multicenter randomized study. *J Clin Oncol.* 1988; 6:1401–1410.
117. Chan AT, Teo PM, Leung TW, Leung SF, Lee WY, Yeo W, et al. A prospective randomized study of chemotherapy adjunctive to definitive



- radiotherapy in advanced nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1995; 33:569–577.
118. Chi KH, Chang YC, Chan WK, Liu JM, Law CK, Lo SS, et al. A phase II study of carboplatin in nasopharyngeal carcinoma. *Oncology.* 1997; 54: 203–207.
119. Teo P, Tsao SY, Shiu W, Leung WT, Tsang V, Yu P, et al. A clinical study of 407 cases of nasopharyngeal carcinoma in Hong Kong. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1989; 17:515–530.
120. Roussy Institute Gustave. Preliminary results of a randomized trial comparing neoadjuvant chemotherapy (cisplatin, epirubicin, bleomycin) plus radiotherapy vs. radiotherapy alone in stage IV (> or = N2, M0) undifferentiated nasopharyngeal carcinoma: a positive effect on progression-free survival. International Nasopharynx Cancer Study Group. VUMCA I trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1996; 35:463–469.
121. Ma J, Mai HQ, Hong MH, Min HQ, Mao ZD, Cui NJ, et al. Results of a prospective randomized trial comparing neoadjuvant chemotherapy plus radiotherapy with radiotherapy alone in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol.* 1998; 19:1350–1357.
122. Chua DT, Sham JS, Choy D, Lorvidhaya V, Sumitsawan Y, Thongprasert S, et al. Preliminary report of the Asian-Oceanian Clinical Oncology Association randomized trial comparing cisplatin and epirubicin followed by radiotherapy versus radiotherapy alone in the treatment of patients with locoregionally advanced nasopharyngeal

- carcinoma. Asian-Oceania Clinical Oncology Association Nasopharynx Cancer Study Group. *Cancer*. 1998; 83:2270–2283.
123. Hareyama M, Sakata K, Shirato H, Nishioka T, Nishio M, Suzuki K, et al. A prospective, randomized trial comparing neoadjuvant chemotherapy with radiotherapy alone in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 2002; 94: 2217–2223.
124. Chan AT, Ma BB, Lo YM, Leung SF, Kwan WH, Hui EP, et al. Phase II study of neoadjuvant carboplatin and paclitaxel followed by radiotherapy and concurrent cisplatin in patients with locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma: therapeutic monitoring with plasma Epstein–Barr virus DNA. *J Clin Oncol*. 2004; 22:3053–3060.
125. Hui EP, Ma BB, Leung SF, King AD, Mo F, Kam MK, et al. Randomized phase II trial of concurrent cisplatin-radiotherapy with or without neoadjuvant docetaxel and cisplatin in advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009; 27:242–249.
126. Chua DT, Sham JS, Kwong DL, Au GK. Treatment outcome after radiotherapy alone for patients with stage I-II nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 2003; 98: 74-80.
127. Chua DT, Sham JS, Kwong DL, Wei W, Au GKH, Choy D. Locally recurrent nasopharyngeal carcinoma: treatment results for patients with computed tomography assessment. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1998; 41:379–386.
128. Chang JT, See LC, Liao CT, Ng SH, Wang CH, Chen IH, et al. Locally recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Radiother Oncol*. 2000; 54:135–142.



129. Öksüz DÇ, Meral G, Uzel Ö, Çağatay P, Turkan S. Reirradiation for locally recurrent nasopharyngeal carcinoma: treatment results and prognostic factors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 60: 388–394.
130. Zheng XK, Ma J, Chen LH, Xia YF, Shi YS. Dosimetric and clinical results of three-dimensional conformal radiotherapy for locally recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Radiother Oncol.* 2005; 75:197–203.
131. Lu TX, Mai WY, Teh BS, Zhao C, Han F, Huang Y, et al. Initial experience using intensity-modulated radiotherapy for recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 58: 682–687.
132. Chua DT, Sham JS, Leung LT, Au GKH. Reirradiation of nasopharyngeal carcinoma with intensity-modulated radiotherapy. *Radiother Oncol.* 2005; 77:290–294.
133. Chua DT, Sham JS, Au GK. Induction chemotherapy with cisplatin and gemcitabine followed by reirradiation for locally recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Am J Clin Oncol.* 2005; 28:464–471.
134. Chua D. Phase II trial of induction chemotherapy followed by external beam re-irradiation and concurrent cetuximab for locoregionally recurrent nasopharyngeal carcinoma. 2009; Proceedings of 2nd International Conference on Innovative Approaches in Head and Neck Oncology, Abstract 56.
135. Poon D, Yap SP, Wong ZW, Cheung YB, Leong SS, Wee J, et al. Concurrent chemoradiotherapy in locoregionally recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2004; 59:1312–1318.

136. Law SC, Lam WK, Ng MF, Au SK, Mak WT, Lau WH. Reirradiation of nasopharyngeal carcinoma with intracavitary mold brachytherapy: an effective means of local salvage. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2002; 54:1095–1113.
137. Choy D, Sham JS, Wei WI, Ho CM, Wu PM. Transpalatal insertion of radioactive gold grain for the treatment of persistent and recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993; 25: 505–512.
138. Kwong DL, Wei WI, Cheng AC, Choy DT, Lo AT, Wu PM, et al. Long term results of radioactive gold grain implantation for the treatment of persistent and recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 2001; 91:1105–1113.
139. Buatti JM, Friedman WA, Bova FJ, Mendenhall WM. Linac radiosurgery for locally recurrent nasopharyngeal carcinoma: rationale and technique. *Head Neck.* 1995; 17:14–19.
140. Cmelak AJ, Cox RS, Adler JR, Fee WE, Goffinet DR. Radiosurgery for skull base malignancies and nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997; 37:997–1003.
141. Miller RC, Foote RL, Coffey RJ, Gorman DA, Earle JD, Schomberg PJ, et al. The role of stereotactic radiosurgery in the treatment of malignant skull base tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1997; 39:977–981.
142. Kocher M, Voges J, Staar S, Treuer H, Sturm V, Mueller RP.. Linear accelerator radiosurgery for recurrent malignant tumors of the skull base. *Am J Clin Oncol.* 1998; 21:18–22.

143. Chua DT, Sham JS, Hung KN, Hung KW, Leung LHT, Au GKH. Predictive factors of tumor control and survival after radiosurgery of local failures of nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2006; 66:1415–1421.
144. Wu SX, Chua DT, Deng ML, Zhao C, Li FY, Sham JS, et al. Outcome of fractionated stereotactic radiotherapy for 90 patients with locally persistent and recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2007; 69:761–769.
145. Xiao JP, Xu GZ, Miao YJ. Fractionated stereotactic radiosurgery for 50 patients with recurrent or residual nasopharyngeal carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2001; 51:164–170.
146. Chen HJ, Leung SW, Su CY. Linear accelerator based radiosurgery as a salvage treatment for skull base and intracranial invasion of recurrent nasopharyngeal carcinoma. *Am J Clin Oncol.* 2001; 24:255–258.
147. Fisch U. The infratemporal fossa approach for nasopharyngeal tumors. *Laryngoscope.* 1983; 93:36–44.
148. Morton RP, Liavaag PG, McLean M, Freeman JL. Transcervico-mandibulo-palatal approach for surgical salvage of recurrent nasopharyngeal cancer. *Head Neck.* 1996; 18:352–358.
149. Choi JY, Lee WS. Curative Surgery for Recurrent Nasopharyngeal Carcinoma via the Infratemporal Fossa Approach. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 131(3):213-216.
150. Wei WI, Lam KH, Sham JS. New approach to the nasopharynx: the maxillary swing approach. *Head Neck.* 1991; 13:200–207.

151. Wei WI. Nasopharyngeal cancer: current status of management. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2001; 127:766–769.
152. Ng RW, Wei WI. Elimination of palatal fistula after the maxillary swing procedure. Head Neck. 2005; 27:608–612.
153. Ng RW, Wei WI. Quality of life of patients with recurrent nasopharyngeal carcinoma treated with nasopharyngectomy using the maxillary swing approach. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2006; 132:309–316.
154. Wei WI. Cancer of the nasopharynx: functional surgical salvage. World J Surg. 2003; 27:844–848.
155. Cabanillas R, Llorente JL, Estelrich PM, Martínez-Cassati ME, Franco V, Suárez C. Resultados oncológicos y funcionales de la cirugía de rescate en las recidivas locales de los carcinomas nasofaríngeos. Acta Otorrinolaringol Esp 2005; 56: 416-422.
156. Sham JS, Choy D. Nasopharyngeal carcinoma: treatment of neck node recurrence by radiotherapy. Australas Radiol. 1991; 35:370–373.
157. Wei WI, Lam KH, Ho CM, Sham JS, Lau SK. Efficacy of radical neck dissection for the control of cervical metastasis after radiotherapy for nasopharyngeal carcinoma. Am J Surg. 1990; 160:439–442.
158. Wei WI. Salvage neck dissection after radiation and/or chemotherapy. Oper Tech Otolaryngol. 2004; 15:269–272.
159. Wei WI, Ho CM, Wong MP, Ng WF, Lau SK, Lam KH. Pathological basis of surgery in the management of postradiotherapy cervical metastasis in nasopharyngeal carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1992; 118:923–929.

160. Wei WI, Ho WK, Cheng AC, Wu X, Li GK, Nicholls J, Yuen PW, Sham JS. Management of extensive cervical nodal metastasis in nasopharyngeal carcinoma after radiotherapy: a clinicopathological study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001; 127:1457–1462.
161. Sriuranpong V, Mutirangura A, Gillespie JW, Patel V, Amornphimoltham P, Molinolo AA, et al. Global gene expression profile of nasopharyngeal carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 4944–4958.
162. Hui AB, Lo KW, Teo PM, To KF, Huang DP. Genome wide detection of oncogene amplifications in nasopharyngeal carcinoma by array based comparative genomic hybridization. *Int J Oncol.* 2002; 20:467–473.
163. Or YY, Hui AB, To KF, Lam CN, Lo KW. PIK3CA mutations in nasopharyngeal carcinoma. *Int J Cancer.* 2006; 118:1065–1067.
164. Tao Q, Chan AT. Nasopharyngeal carcinoma: molecular pathogenesis and therapeutic developments. *Expert Rev Mol Med.* 2007; 9:1–24.
165. Lo KW, Huang DP, Lau KM. P16 gene alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 1995; 55:2039–2043.
166. Kwong J, Lo KW, To KF, Teo PM, Johnson PJ, Huang DP. Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:131–137.
167. Lo KW, Kwong J, Hui AB, Chan SY, To KF, Chan AS, et al. High frequency of promoter hypermethylation of RASSF1A in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2001; 61:3877–3881.
168. Lo KW, Huang DP. Genetic and epigenetic changes in nasopharyngeal carcinoma. *Semin Cancer Biol.* 2002; 12:451–462.

169. Hui AB, Lo KW, Teo PM, To KF, Huang DP. Genome wide detection of oncogene amplifications in nasopharyngeal carcinoma by array based comparative genomic hybridization. *Int J Oncol.* 2002; 20:467–473.
170. Ma B, Poon T, KF To, Zee B, Mo FK, Chan CM, et al. Expression and prognostic significance of epidermal growth factor receptor and HER2 protein in nasopharyngeal carcinoma. *Head Neck.* 2003; 25:864–872.
171. Sung FL, Poon TC, Hui EP, Ma BB, Lionge E, To KF, et al. Antitumor effect and enhancement of cytotoxic drug activity by cetuximab in nasopharyngeal carcinoma cells. *In Vivo.* 2005; 19: 237–245.
172. Hsu CH, Chen CL, Yeh PY, Cheng AL. Inhibitors of epidermoid growth factor receptor suppress cell growth and enhance chemosensitivity of nasopharyngeal cancer cells in vitro. *Oncology.* 2002; 68:538–547.
173. Chan AT, Hsu MM, Goh BC, Hui EP, Liu TW, Millward MJ, et al. Multicenter, phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in patients with recurrent or metastatic nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 3568–3576.
174. Ma B, Hui EP, King A, To KF, Mo F, Leung FS, et al. A phase II study of gefitinib in patients with metastatic or locoregionally recurrent nasopharyngeal carcinoma and evaluation of plasma Epstein–Barr virus DNA as a biomarker of efficacy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2007; 62:59–64.
175. Lee SC, Lim SG, Soo R, Hsieh WS, Guo, JY, Putti T, et al. Lack of somatic mutations in EGFR tyrosine kinase domain in hepatocellular and nasopharyngeal carcinoma. *Pharmacogenet Genomics.* 2006; 16:73–74.



176. Sung FL, Hui EP, Tao Q, Tsui NB, Lo YM, Ma BB, et al. Genome-wide expression analysis using microarray identified complex signaling pathways modulated by hypoxia in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 2007; 253:74–88.
177. Hui EP, Chan AT, Pezzella F, Helen Turley H, Ka-Fai To KF, Poon TC, et al. Coexpression of hypoxia-inducible factors 1alpha and 2alpha, carbonic anhydrase IX, and vascular endothelial growth factor in nasopharyngeal carcinoma and relationship to survival. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:2595–2604.
178. Elser C, Siu LL, Winquist E, Agulnik M, Pond GR, Chin SF, et al. Phase II trial of sorafenib in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck or nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol.* 2007; 25:3766–3773.
179. Hui EP, Ma BB, King AD, Mo F, Chan SL, Kam MK, et al. Hemorrhagic complications in a phase II study of sunitinib in patients of nasopharyngeal carcinoma who has previously received high-dose radiation. *Ann Oncol.* 2011; 22(6):1280-1287.
180. Lee NY, Zhang Q, Pfister DG, Kim J, Garden AS, Mechalakos J, et al. Addition of bevacizumab to standard chemoradiation for locoregionally advanced nasopharyngeal carcinoma (RTOG 0615): a phase 2 multi-institutional trial. *Lancet Oncol.* 2012; 13(2): 172-180.
181. Ambinder RF, Robertson KD, Tao Q. DNA methylation and the Epstein–Barr virus. *Semin Cancer Biol.* 1999; 9: 369–375.

182. Chan A, Tao Q, Keith D, Flinn IW, Mann RB, Klencke B, et al. Azacitidine induces demethylation of the Epstein–Barr virus genome in tumors. *J Clin Oncol*. 2004; 22:1373–1381.
183. Hsieh WS, Tan EH, Lim WT, Soo RA, Chan AT, A phase IB trial of 5-azacitidine (5AC) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) in patients with metastatic or locally recurrent nasopharyngeal carcinoma (NPC) and NK-T cell lymphoma. *J Clin Oncol*. 2013; 31, suppl; abstr e17017. En: <http://meetinglibrary.asco.org/content/113749-132>.
184. Zhang X, Li W, Li H, Ma Y, He G, Tan G. Genomic methylation profiling combined with gene expression microarray reveals the aberrant methylation mechanism involved in nasopharyngeal carcinoma taxol resistance. *Anticancer Drugs*. 2012; 23(8):856-64.
185. Herbst RS. Review of epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; 59:21–26.
186. Miettinen PJ, Berger JE, Meneses J, Phung Y, Pedersen RA, Werb Z, et al. Epithelial immaturity and multiorgan failure in mice lacking epidermal growth factor receptor. *Nature*. 1995; 376:337–341.
187. Sheen TS, Huang YT, Chang YL. Epstein–Barr virus-encoded latent membrane protein 1 co-expresses with epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma. *Jpn J Cancer Res*. 1999; 90:1285–1292.
188. Chua DT, Nicholls JM, Sham JS. Prognostic value of epidermal growth factor receptor expression in patients with advanced stage nasopharyngeal carcinoma treated with induction chemotherapy and radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2004; 59:11–20.

189. Pan J, Kong L, Lin S, Chen Q, Lu JJ. The clinical significance of coexpression of cyclooxygenases-2, vascular endothelial growth factors, and epidermal growth factor receptor in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 2008; 118:1970–1975.
190. Normanno N, De Luca A, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer. *Gene*. 2006; 366:2–16.
191. Nishi H, Nishi KH, Johnson AC. Early growth response-1 gene mediates up-regulation of epidermal growth factor receptor expression during hypoxia. *Cancer Res*. 2002; 62: 827–834.
192. Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. Signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*. 2001; 37:S3–8.
193. Zheng X, Hu L, Chen F, Christensson B. Expression of Ki67 antigen, epidermal growth factor receptor and Epstein–Barr virus encoded latent membrane protein (LMP1) in nasopharyngeal carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994; 30B:290–295.
194. Miller WE, Cheshire JL, Baldwin AS Jr, Raab-Taub N. The NPC derived C15 LMP1 protein confers enhanced activation of NF-kappa B and induction of the EGFR in epithelial cells. *Oncogene*. 1998; 16:1869–1877.
195. Mainou BA, Everly DN Jr, Raab-Traub N. Epstein–Barr virus latent membrane protein 1 CTAR1 mediates rodent and human fibroblast transformation through activation of PI3K. *Oncogene*. 2005; 24:6917–6924.



196. Soo R, Putti T, Tao Q, Boon-Cher G, Kang-Hoe L, Loh KS, et al. Overexpression of cyclooxygenase-2 in nasopharyngeal carcinoma and association with epidermal growth factor receptor expression. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 131:147–152.
197. Ma BB, Poon TC, To KF, Zee B, Mo FK, Chan CM, et al. Prognostic significance of tumor angiogenesis, Ki 67, p53 oncoprotein, epidermal growth factor receptor and HER2 receptor protein expression in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma – a prospective study. *Head Neck.* 2003; 25: 864–872.
198. Stacker SA, Caesar C, Baldwin ME, Thornton GE, Williams RA, Prevo R, et al. VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics. *Nat Med.* 2001; 7:186–191.
199. Krishna SM, James S, Balaram P. Expression of VEGF as prognosticator in primary nasopharyngeal cancer and its relation to EBV status. *Virus Res.* 2006; 115:85–90.
200. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82:4–6.
201. Folkman J. Seminars in medicine of the Beth Israel hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med.* 1995; 333:1757–1763.
202. Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* 2002; 29:10–14.
203. Kyzas PA, Cunha IW, Ionnidis JPA. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor immunohistochemical expression in head and

- neck squamous cell carcinoma: A meta-analysis. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 1434–1440.
204. Wakisaka N, Wen QH, Yoshizaki T, Nishimura T, Furukawa M, Kawahara E, et al. Association of vascular endothelial growth factor expression with angiogenesis and lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope.* 1999; 109:810–814.
205. Guang-Wu H, Sunagawa M, Jie-En L, Shimada S, Gang Z, Tokeshi Y, et al. The relationship between microvessel density, the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), and the extension of nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope.* 2000; 110: 2066–2069.
206. Foote RL, Weidner N, Harris J, Hammond E, Lewis JE, Vuong T, et al. Evaluation of tumor angiogenesis measured with microvessel density (MVD) as a prognostic indicator in nasopharyngeal carcinoma: results of RTOG 9505. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2005; 61: 745–753.
207. Qian CN, Zhang CQ, Guo X, Hong MH, Cao SM, Mai WY, et al. Elevation of serum vascular endothelial growth factor in male patients with metastatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 2000; 88:255–261.
208. Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. *Oral Oncol.* 2003;39:222-31
209. Yoshizaki T, Ito M, Murono, S, Wakisaka N, Kondo, S, Endo K. Current understanding and management of nasopharyngeal carcinoma. *Auris Nasus Larynx.* 2012 Apr 39(2): 137-144.
210. Chen MK, Lee HS, Chang JH, Chang CC. Expression of p53 protein and primary tumour volume in patients with nasopharyngeal carcinoma. *J Otolaryngol.* 2004; 33: 304-307.

211. Wu HC, Lu TY, Lee JJ, Hwang JK, Lin YJ, Wang CK, et al. MDM2 expression in EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Lab Invest.* 2004; 84: 1547-1556.
212. Murono S, Yoshizaki T, Park CS, Furukawa M. Association of Epstein-Barr virusinfection with p53 protein accumulation but not bcl-2 protein in nasopharyngealcarcinoma. *Histopathology.* 1999; 34: 432-438.
213. Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG. ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell.* 1998; 92: 725-34.
214. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dotsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell.* 1998; 2: 305-316.
215. Crook T, Nicholls JM, Brooks L, O'Nions J, Allday MJ. High level expression of delta N-p63: a mechanism for the inactivation of p53 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma (NPC)? *Oncogene.* 2000; 19: 3439-3444.
216. Potapova O, Gorospe M, Dougherty RH, Dean NM, Gaarde WA, Holbrook NJ. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 2000; 20:1713-1722.
217. Sheu LF, Chen A, Lee HS, Hsu HY, Yu DS. Cooperative interactions among p53, bcl-2 and Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in nasopharyngeal carcinoma cells. *Pathol Int.* 2004; 54: 475-485.

218. Shibosawa E, Tsutsumi K, Koizuka I, Hoshikawa M, Takakuwa T. Absence of nuclear p16 from Epstein-Barr virus-associated undifferentiated nasopharyngeal carcinomas. *Laryngoscope*. 2000; 110: 93-97.
219. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 1995; 81: 323-330.
220. El-Naggar AK, Lai S, Clayman GL, Zhou JH, Tucker SA, Myers J, et al. Expression of p16, Rb, and cyclin D1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implications. *Hum Pathol*. 1999; 30:1013-1018.
221. Gulley ML, Nicholls JM, Schneider BG, Amin MB, Ro JY, Geradts J. Nasopharyngeal carcinomas frequently lack the p16/MTS1 tumor suppressor protein but consistently express the retinoblastoma gene product. *Am J Pathol*. 1998; 152: 865-869.
222. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 1996; 56: 3630-3633.
223. Song X, Tao YG, Deng XY, Jin X, Tan YN, Tang M, et al. Heterodimer formation between c-Jun and Jun B proteins mediated by Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1. *Cell Signal*. 2004; 16: 1153-1162.
224. Ohtani N, Brennan P, Gaubatz S, Sanij E, Hertzog P, Wolvetang E, et al. Epstein-Barr virus LMP1 blocks p16INK4a-RB pathway by promoting nuclear export of E2F4/5. *J Cell Biol*. 2003; 162: 173-183.

225. Rayman JB, Takahashi Y, Indjeian VB, Dannenberg JH, Catchpole S, Watson RJ, et al. E2F mediates cell cycle-dependent transcriptional repression in vivo by recruitment of an HDAC1/mSin3B corepressor complex. *Genes Dev.* 2002;16: 933-947.
226. Hwang CF, Cho CL, Huang CC, Wang JS, Shih YL, Su CY, et al. Loss of cyclin D1 and p16 expression correlates with local recurrence in nasopharyngeal carcinoma following radiotherapy. *Ann Oncol.* 2002; 13: 1246-1251.
227. Makitie AA, MacMillan C, Ho J, Shi W, Lee A, O'Sullivan B, et al. Loss of p16 expression has prognostic significance in human nasopharyngeal carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 2177-2184.
228. Wang GL, Lo KW, Tsang KS, Chung NY, Tsang YS, Cheung ST, et al. Inhibiting tumorigenic potential by restoration of p16 in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer.* 1999; 81: 1122-6.
229. Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5:997–1014.
230. Jou TS, Stewart DB, Stappert J, Nelson WJ, Mars JA. Genetic and biochemical dissection of protein linkages in the cadherin catenin complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 92:5067–5071.
231. Shi W, Bastianutto C, Li A, Perez-Ordóñez B, Perez-Ordóñez B, Ng R, Chow KY, et al. Multiple dysregulated pathways in nasopharyngeal carcinoma revealed by gene expression profiling. *Int J Cancer.* 2006; 119: 2467–2475.



232. Zeng ZY, Zhou YH, Zhang WL, Xiong W, Fan SQ, Li XL, et al. Gene expression profiling of nasopharyngeal carcinoma reveals the abnormally regulated Wnt signaling pathway. *Hum Pathol.* 2007; 38: 120–133.
233. Lin YC, You L, Xu Z, He B, Mikami I, Thung E, Chou J, et al. Wnt signaling activation and WIF-1 silencing in nasopharyngeal cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 341:635–40.
234. Morrison JA, Gulley ML, Pathmanathan R, Raab-Traub N. Differential signaling pathways are activated in the Epstein–Barr virus-associated malignancies nasopharyngeal carcinoma and Hodgkin lymphoma. *Cancer Res.* 2004; 64: 5251–5260.
235. Ren Q, Sato H, Muroso S, Furukawa M, Yoshizaki T. Epstein–Barr virus (EBV) latent membrane protein 1 induces interleukin-8 through the nuclear factor-kappa B signaling pathway in EBV infected nasopharyngeal carcinoma cell line. *Laryngoscope.* 2004; 114:855–859.
236. Chou J, Lin YC, Kim J, Yu L, Xu Z, He B, et al. Nasopharyngeal carcinoma review of the molecular mechanisms of tumorigenesis. *Head Neck.* 2008; 30:946–963.
237. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116:281–297.
238. Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008; 9:219–230.
239. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004; 431:350–355.

240. Cosmopoulos K, Pegtel M, Hawkins J, Moffett H, Carl Novina C, Middeldorp J, et al. Comprehensive profiling of Epstein–Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol*. 2009; 83:2357–2367.
241. Swaminathan S. Noncoding RNAs produced by oncogenic human herpesviruses. *J cell physiol*. 2008; 216:321–326.
242. Kaykas A, Sugden B. The amino-terminus and membrane spanning domains of LMP1 inhibit cell proliferation. *Oncogene*. 2000; 19:1400–1410.
243. Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, et al. MicroRNA 29c is down-regulated in nasopharyngeal carcinomas, upregulating mRNAs encoding extracellular matrix proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:5874–5878.
244. Cheung CCM, Chung GTY, Wei-Man S, To KF, Choy KW, Lau KM, et al. miR-31 is consistently inactivated in EBV-associated nasopharyngeal carcinoma and contributes to its tumorigenesis. *Molecular Cancer* 2014, 13:184.
245. Nie G, Duan H, Li X, Yu Z, Luo L, Lu R, et al. MicroRNA-205 promotes the tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through targeting tumor protein p53-inducible nuclear protein 1. *Mol Med Rep*. 2015; 12(4): 5715–5722.
246. Chen HC, Chen GH, Chen YH, Liao WL, Liu CY, Chang KP, et al. MicroRNA deregulation and pathway alterations in nasopharyngeal carcinoma. *Br J Cancer*. 2009; 100: 1002–1011.
247. McClendon AK, Osheroff N. DNA topoisomerase II, genotoxicity, and cancer. *Mutat Res* 2007; 623: 83–97.

248. Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3: 430–440.
249. Wang JC. DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem.* 1996; 65: 635–692.
250. Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function, and mechanism. *Annu Rev Biochem.* 2001; 70: 369–413.
251. Schoeffler AJ, Berger JM. Recent advances in understanding structure-function relationships in the type II topoisomerase mechanism. *Biochem Soc Trans.* 2005; 33: 1465–1470.
252. Leppard JB, Champoux JJ. Human DNA topoisomerase I: relaxation, roles, and damage control. *Chromosoma.* 2005; 114: 75–85
253. Fortune JM, Osheroff N. Topoisomerase II as a target for anticancer drugs: when enzymes stop being nice. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2000; 64: 221–253.
254. Wang JC. Moving one DNA double helix through another by a type II DNA topoisomerase: the story of a simple molecular machine. *Quart Rev Biophys.* 1998; 31: 107–144.
255. Berger JM, Gamblin SJ, Harrison SC, Wang JC. Structure and mechanism of DNA topoisomerase II. *Nature.* 1996; 379: 225–232.
256. Wilstermann AM, Osheroff N. Stabilization of eukaryotic topoisomerase II-DNA cleavage complexes. *Curr Top Med. Chem.* 2003; 3: 321–338.
257. McClendon AK, Rodriguez AC, Osheroff N. Human topoisomerase IIa rapidly relaxes positively supercoiled DNA: implications for enzyme action ahead of replication forks. *J Biol Chem.* 2005; 280: 39337–39345
258. Grue P, Grasser A, Sehested M, Jensen PB, Uhse A, Straub T, et al. Essential mitotic functions of DNA topoisomerase IIa are not adopted by

- topoisomerase IIb in human H69 cells. *J Biol Chem.* 1998; 273: 33660–33666.
259. Kimura K, Saijo M, Ui M, Enomoto T. Growth state and cell cycle-dependent fluctuation in the expression of two forms of DNA topoisomerase II and possible specific modification of the higher molecular weight form in the M phase. *J Biol Chem.* 1994; 269: 1173–1176.
260. Yang X, Li W, Prescott ED, Burden SJ, Wang JC. DNA topoisomerase IIb and neural development. *Science.* 2000; 287: 131–134.
261. Isaacs RJ, Davies SL, Sandri MI, Redwood C, Wells NJ, Hickson ID. Physiological regulation of eukaryotic topoisomerase II. *Biochim Biophys Acta.* 1998; 1400: 121–137.
262. Ju BG, Lunyak VV, Perissi V, Garcia-Bassets I, Rose DW, Glass CK, et al. A topoisomerase IIb-mediated dsDNA break required for regulated transcription. *Science.* 2006; 312: 1798–1802.
263. Wendorff JT, Schmidt BH, Heslop P, Austin CA, Berger JM. The Structure of DNA-Bound Human Topoisomerase II Alpha: Conformational Mechanisms for Coordinating Inter-Subunit Interactions with DNA Cleavage. *J Mol Biol.* 2012; 424(3-4): 109–124.
264. Williams NL, Maxwell A. Probing the two-gate mechanism of DNA gyrase using cysteine crosslinking. *Biochemistry.* 1999; 38:13502–13511.
265. Schoeffler AJ, May AP, Berger JM. A domain insertion in *Escherichia coli* GyrB adopts a novel fold that plays a critical role in gyrase function. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:7830–7844.

266. Deweese JE, Guengerich FP, Burgin AB, Osheroff N. Metal ion interactions in the DNA cleavage/ligation active site of human topoisomerase II alpha. *Biochemistry*. 2009; 48:8940–8947.
267. Winn MD, Ballard CC, Cowtan KD, Dodson EJ, Emsley P, Evans PR, et al. Overview of the CCP4 suite and current developments. *Crystallogr*. 2011; 67:235–242.
268. Pritchard KI, Messersmith H, Elavathil L, Trudeau M, O'Malley F, Dhesy-Thind B. HER-2 and Topoisomerase II As Predictors of Response to Chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2008; 26:736-744.
269. Kier MG, Lauritsen J, Mortensen MS, Bandak M, Andersen KK, Hansen MK, et al. Prognostic Factors and Treatment Results After Bleomycin, Etoposide, and Cisplatin in Germ Cell Cancer: A Population-based Study. *Eur Urol*. 2016; S 0302-2838(16): 30637-30646.
270. Isola J, Tanner M, Holli K. Amplification of topoisomerase II alpha is a strong predictor of response to epirubicin-based chemotherapy in HER-2/neu positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2000; 64:S15.
271. Jarvinen TA, Tanner M, Borg A, Isola J. Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 1999; 26:142-150.
272. Knoop AS, Knudsen H, Balslev E, Rasmussen BB, Overgaard J, Nielsen KV, et al. Retrospective analysis of topoisomerase IIa amplifications and deletions as predictive markers in primary breast cancer patients randomly assigned to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil

- or cyclophosphamide, epirubicin, and fluorouracil. Danish Breast Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol.* 2005; 23:7483-7490.
273. Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. BCIRG 006: 2nd interim analysis phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (AC/ET) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (AC/ETH) with docetaxel carboplatin and trastuzumab (TCH) in Her-2/neu positive early breast cancer patients. 29th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium. 2006; 14-17.
274. Brase JC, Schmidt M, Fischbach T, Sültmann H, Bojar H, Koelbl H, et al. ERBB2 and TOP2A in Breast Cancer: A Comprehensive Analysis of Gene Amplification, RNA Levels, and Protein Expression and Their Influence on Prognosis and Prediction. *Clin Cancer Res.* 2010; 16(8); 2391–401.
275. Huang H, Liu J, Meng Q, Niu G. Multidrug resistance protein and topoisomerase 2 alpha expression in non-small cell lung cancer are related with brain metastasis postoperatively. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(9):11537-11542.
276. Tarpgaard LS, Qvortrup C, Nygård SB, Nielsen SL, Andersen D, Jensen NF, et al. A phase II study of Epirubicin in oxaliplatinresistant patients with metastatic colorectal cancer and TOP2A gene amplification. *BMC Cancer.* 2016; 16: 91.
277. Wong N, Yeo W, Wong WL, Wong NLY. TOP2A overexpression in hepatocellular carcinoma correlates with early age onset, shorter patients survival and chemoresistance. *Int. J. Cancer.* 2009; 124, 644–652.

278. Da Cunha IW, De Brot L, Carvalho KC, Rocha RM, Fregnani JH, Falzoni R, et al. Prognostication of Soft Tissue Sarcomas Based on Chromosome 17q Gene and Protein Status: Evaluation of TOP2A, HER-2/neu, and Survivin. *Ann Surg Oncol*. 2012; 19:1790–1799.
279. Gooble RM, Qin LX, Brill ER, Angeles CV, Ugras S, O'Connor RB, et al. Expression Profiling of Liposarcoma Yields a Multigene Predictor of Patient Outcome and Identifies Genes That Contribute to Liposarcomagenesis. *Cancer Res*. 2011; 71(7); 2697–705.
280. Crago AM, Singer S. Clinical and Molecular Approaches to Well-differentiated and Dedifferentiated Liposarcoma. *Curr Opin Oncol*. 2011; 23(4): 373–378.
281. Nitiss JL. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:338–350.
282. Toyoda, Kagaya S, Cowell IG, Kurosawa A, Kamoshita K, Nishikawa K, et al. NK314, a Topoisomerase II Inhibitor That Specifically Targets the  $\alpha$  Isoform. *J Biol Chem*. 2008; 283(35): 23711–23720.
283. Onda T, Toyoda E, Miyazaki O, Seno C, Kagaya S, Okamoto K, . NK314, a novel topoisomerase II inhibitor, induces rapid DNA double-strand breaks and exhibits superior antitumor effects against tumors resistant to other topoisomerase II inhibitors. *Cancer Letters*. 2008; 259 (1): 99–110.
284. Lan J, Huang HY, Lee SW, Chen TJ, Tai HC, Hsu HP, et al. TOP2A overexpression as a poor prognostic factor in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biol*. 2014; 35:179–187.

285. Edge S, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. AJCC Cancer Staging Handbook: From the AJCC Cancer Staging Manual. New York: Springer-Verlag; 2010.
286. Pérez Plasencia D, Gómez Gonzalez JL, Santa Cruz Ruiz S, Muñoz Herrera A, Mateos Perez M, Flores T, et al. Estudio clínico descriptivo de 40 pacientes con carcinoma de nasofaringe en estadio avanzado en un área de bajo riesgo epidemiológico. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002; 53: 473-480.
287. Rovirosa A, Guedea F. Tratamiento con Radioterapia y Radioquimioterapia de los tumores rinosinusales y de Rinofaringe. En: Suárez C, Gil Carcedo L.M., Marco J, Medina H.E, Ortega P y Trinidad J. Tratado de otorrinolaringología y cirugía de cabeza y cuello. Madrid: Panamericana; 2008. p. 3197- 3206.
288. Vaughan TL, Shapiro JA, Burt RD, Swanson GM, Berwick M, Lynch CF, et al. Nasopharyngeal cáncer in a low risk population: Defining risk factors by histological type. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5: 587-593.
289. Escamilla Carpintero Y, Aguilà Artal AF, Bonfill Abella T, Mur Restoy E, Díaz Argüello JJ. Carcinoma nasofaríngeo. Revisión retrospectiva de 23 años en nuestro centro. *O.R.L. ARAGON* 2015; 18 (1): 15-20.
290. Breda E, Catarino R, Azevedo I, Fernandes T, Barreira C, Medeiros R. Caracterización de la evolución clínica del carcinoma de la nasofaringe en una población portuguesa. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007; 58: 191-197.



291. Aparicio J, Llorca C, Montalar J. Carcinoma de nasofaringe. En: González Barón M, ed. *Cáncer de cabeza y cuello*. Madrid: Ediciones Ergon S.A; 1995.p. 207-222.
292. Wendorff JT, Schmidt BH, Heslop P, Austin CA, Berger JM. The Structure of DNA-Bound Human Topoisomerase II Alpha: Conformational Mechanisms for Coordinating Inter-Subunit Interactions with DNA Cleavage. *J Mol Biol.* 2012; 424(3-4): 109–124.
293. Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature.* 1997; 386 (6627): 761-763.
294. Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B, Lengauer C. Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 1999; 9 (12): 57-60.
295. Kim JS, Kim SY, Lee M, Kim SH, Kim SM, Kim EJ. Radioresistance in a human laryngeal squamous cell carcinoma cell line is associated with DNA methylation changes and topoisomerase II  $\alpha$ . *Cancer Biol Ther.* 2015; 16 (4): 558-566.



**TABLAS DE CORRELACIÓN ADICIONALES:**Tabla 20: Expresión TOPOIIA/Tipo histológico

<b>TOPOIIA/OMS</b>	TOPOIIA -	TOPOIIA+	Total
Escamoso queratinizante	4 (6,9%)	2 (3,4%)	6 (10,3%)
Escamoso no queratinizante diferenciado	6 (10,3%)	5 (8,6%)	11 (19%)
Indiferenciado	21 (36,2%)	14 (24,1%)	35 (60,3%)
Total	32 (55,2)	26 (44,8%)	58 (100%)

P= 0,29

Tabla 21: Expresión de la TOPOIIA/Factores clínico-radiológicos positivos

<b>Expresión TOPOIIA</b>	TOPOIIA -	TOPOIIA +	Total	P
Invasión espacio retrofaríngeo	8 (13,6%)	8 (13,6%)	16 (27,2%)	0,6
Pares craneales	3 (5,2%)	2 (3,4%)	5 (5,6%)	0,2
Erosión base del cráneo	5 (8,6%)	10 (17,2%)	15 (25,8%)	0,1

Tabla 22: Expresión TOPOIIA/Recidiva

<b>TOPOIIA/Recidiva</b>	<b>TOPOIIA -</b>	<b>TOPOIIA +</b>	<b>Total</b>
Recidiva: Sí	6 (10,3%)	6 (10,3%)	12 (20,7%)
Recidiva: No	26 (44,8%)	20 (34,5%)	46 (79,3%)
Total	32 (55,2%)	26 (44,8%)	58 (100%)

P= 0,68

Tabla 23: Expresión TOPOIIA/Estado del último control (EUC)

<b>TOPOIIA/EUC</b>	<b>TOPOIIA -</b>	<b>TOPOIIA+</b>	<b>Total</b>
VSE	19 (32,8%)	11 (19%)	30 (51,7%)
VCE	1 (1,7%)	1 (1,7%)	2 (3,4%)
Exitus	12 (20,7%)	14 (24,1%)	26 (44,8%)
Total	32 (55,2%)	26 (44,8%)	58 (100%)

P= 0,43



UNIVERSIDAD  
DE MÁLAGA

**IX. ANEXO II**

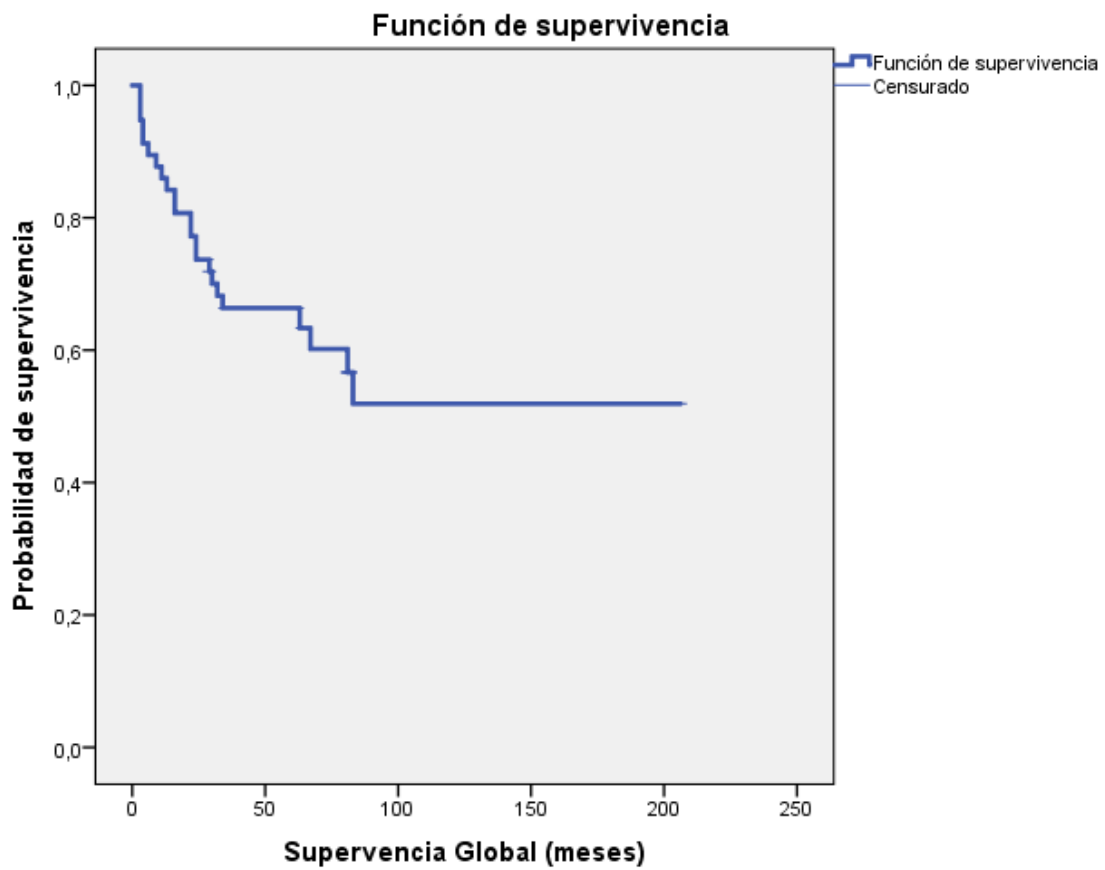
**FIGURAS ADICIONALES:****Figura 2:** Supervivencia específica

Figura 8: Supervivencia global/Edad

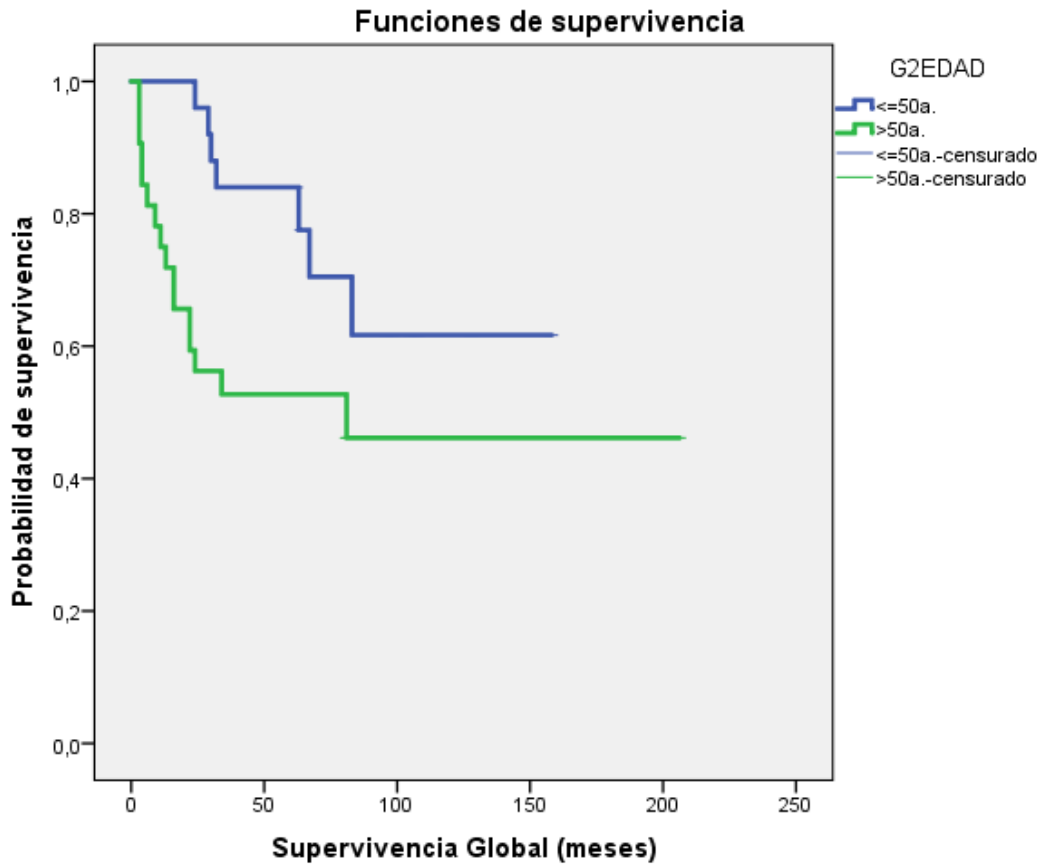


Figura 9: Supervivencia global/Género

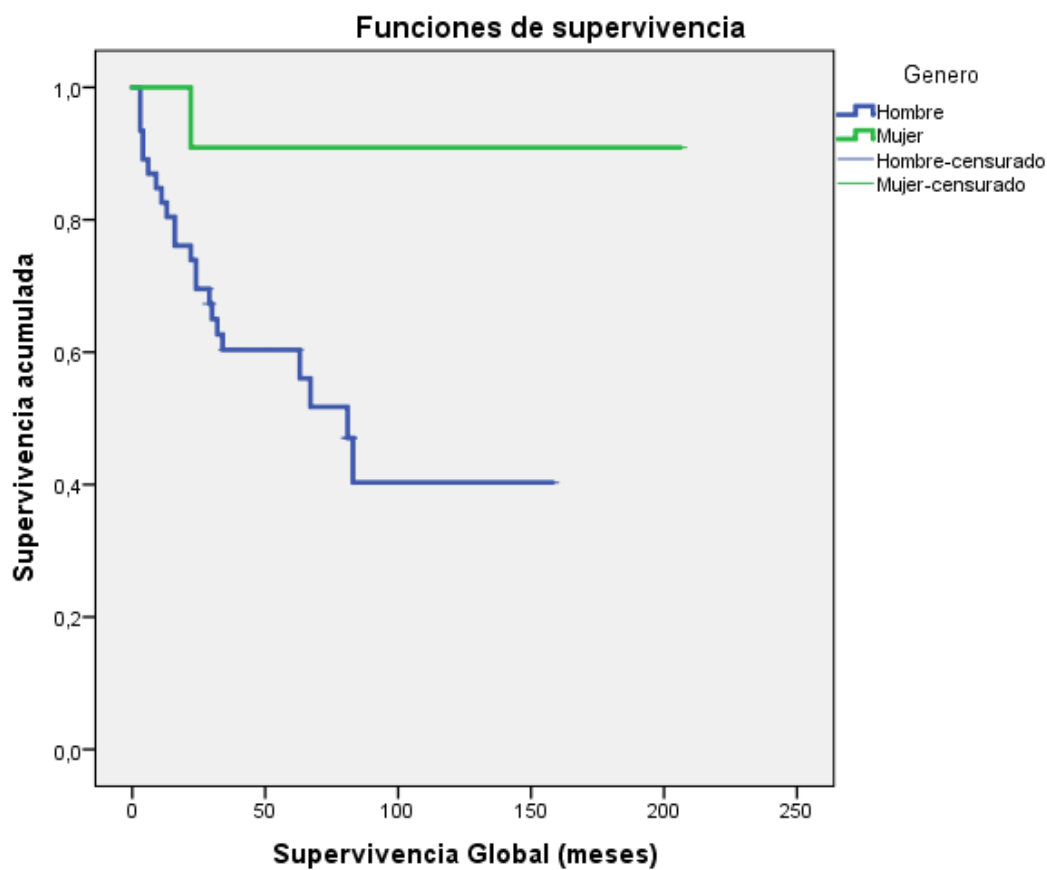




Figura 10: Supervivencia global/Hábito tabáquico

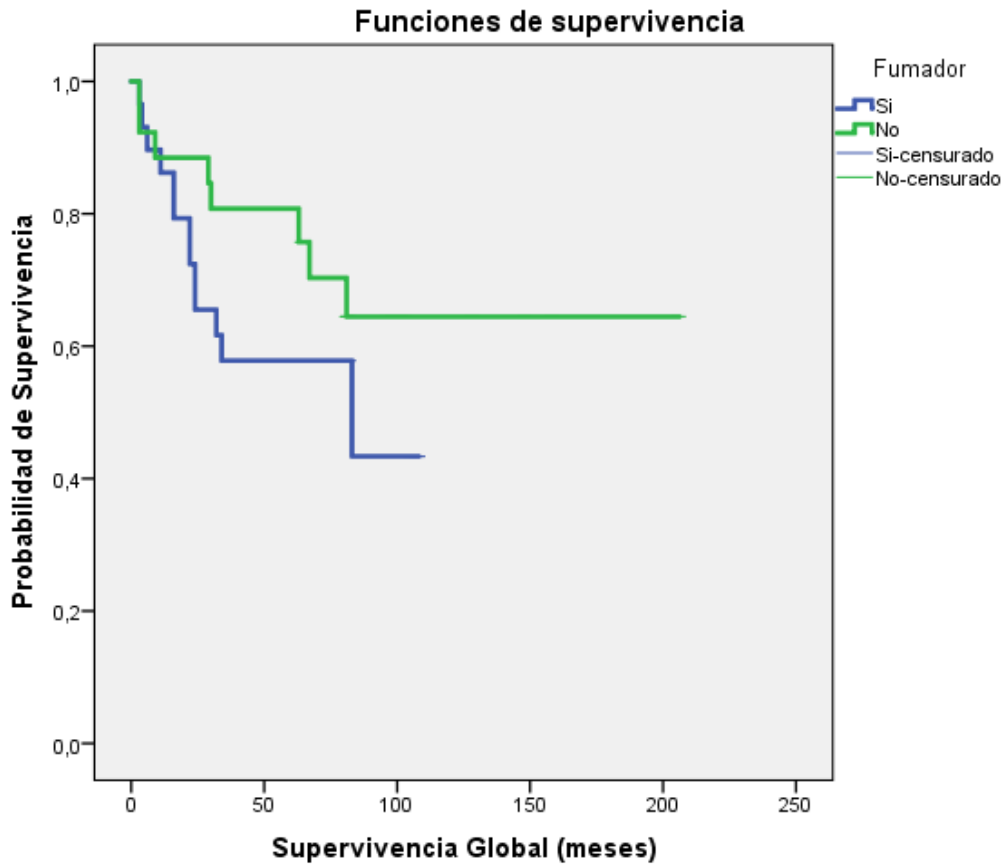


Figura 11: Supervivencia global/Categoría T

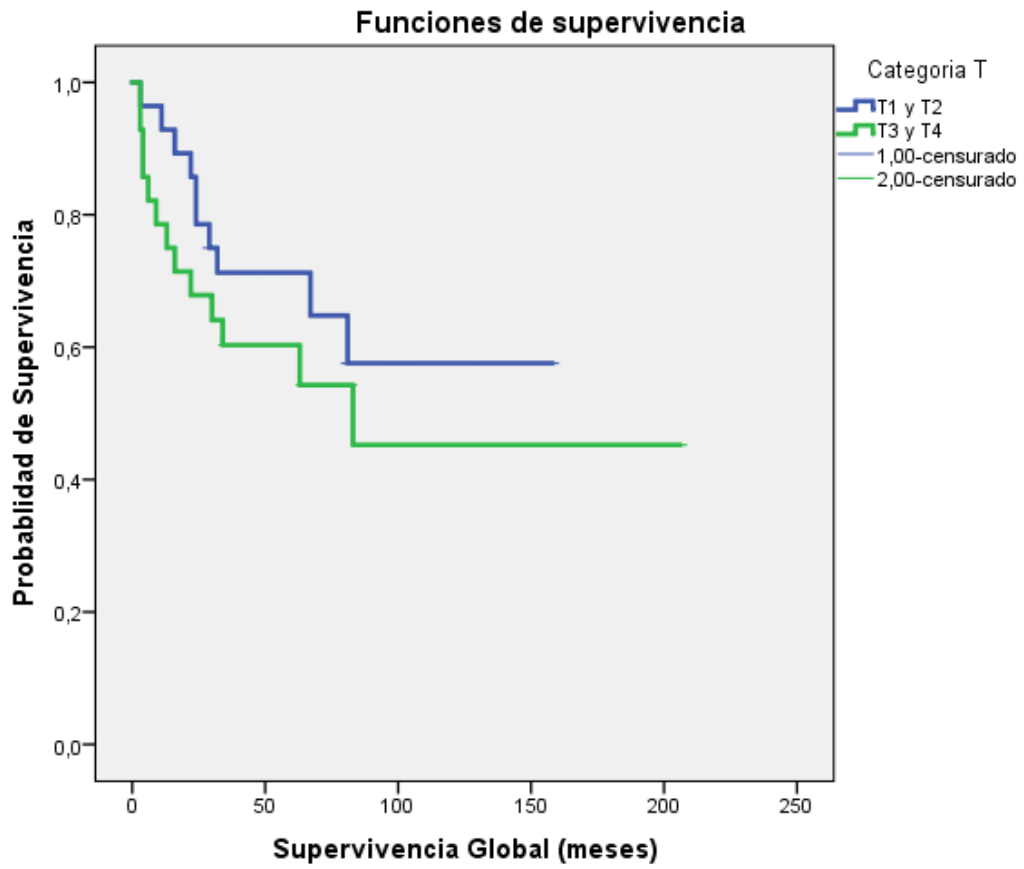


Figura 12: Supervivencia global/Categoría N

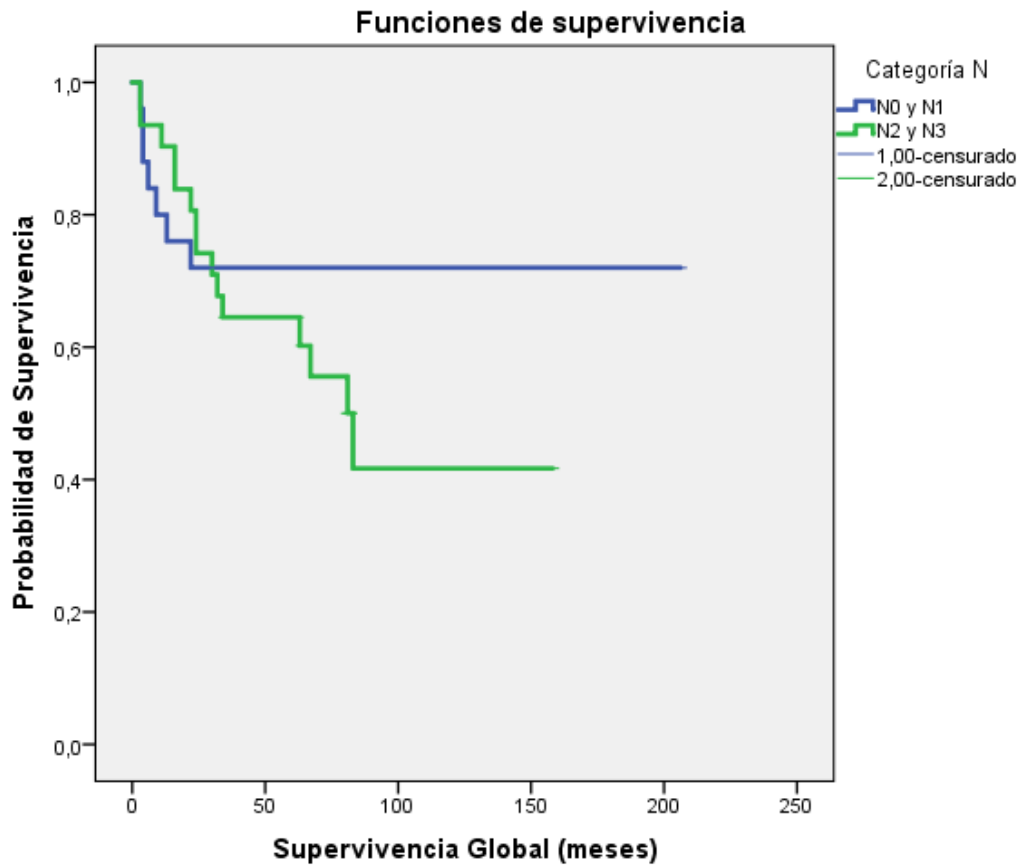


Figura 13: Supervivencia global/Categoría M

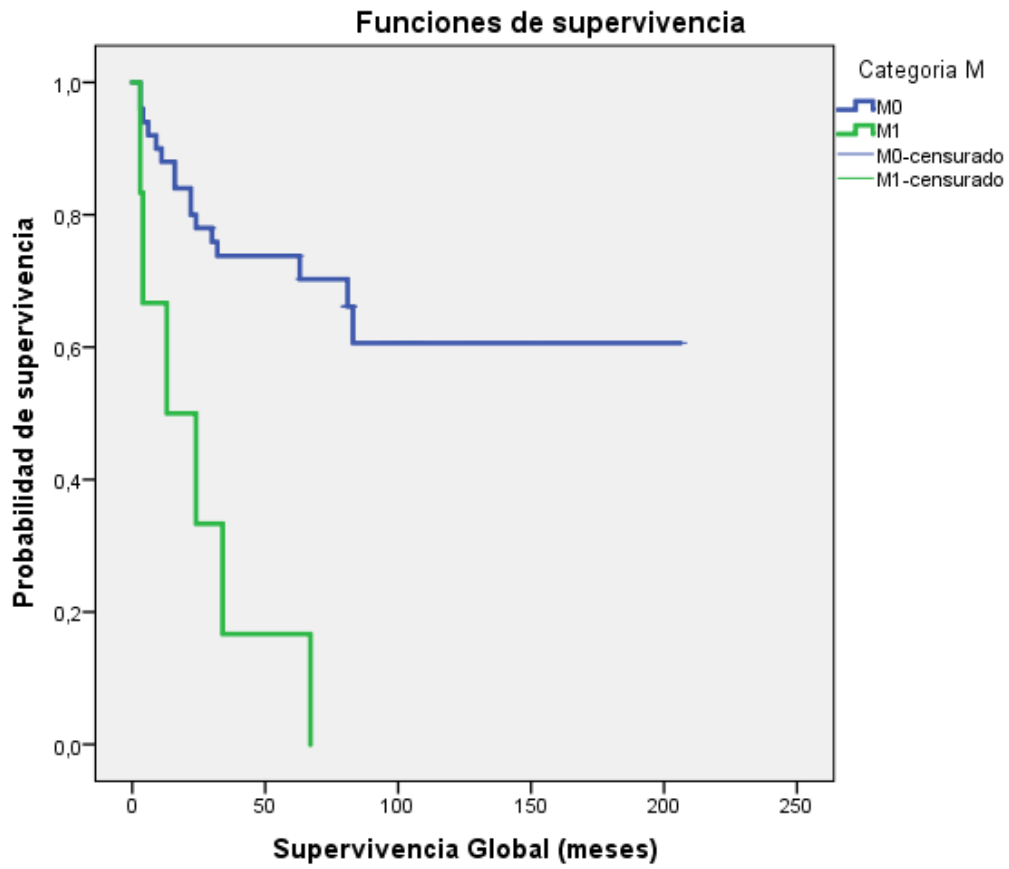


Figura 14: Supervivencia/Estadio

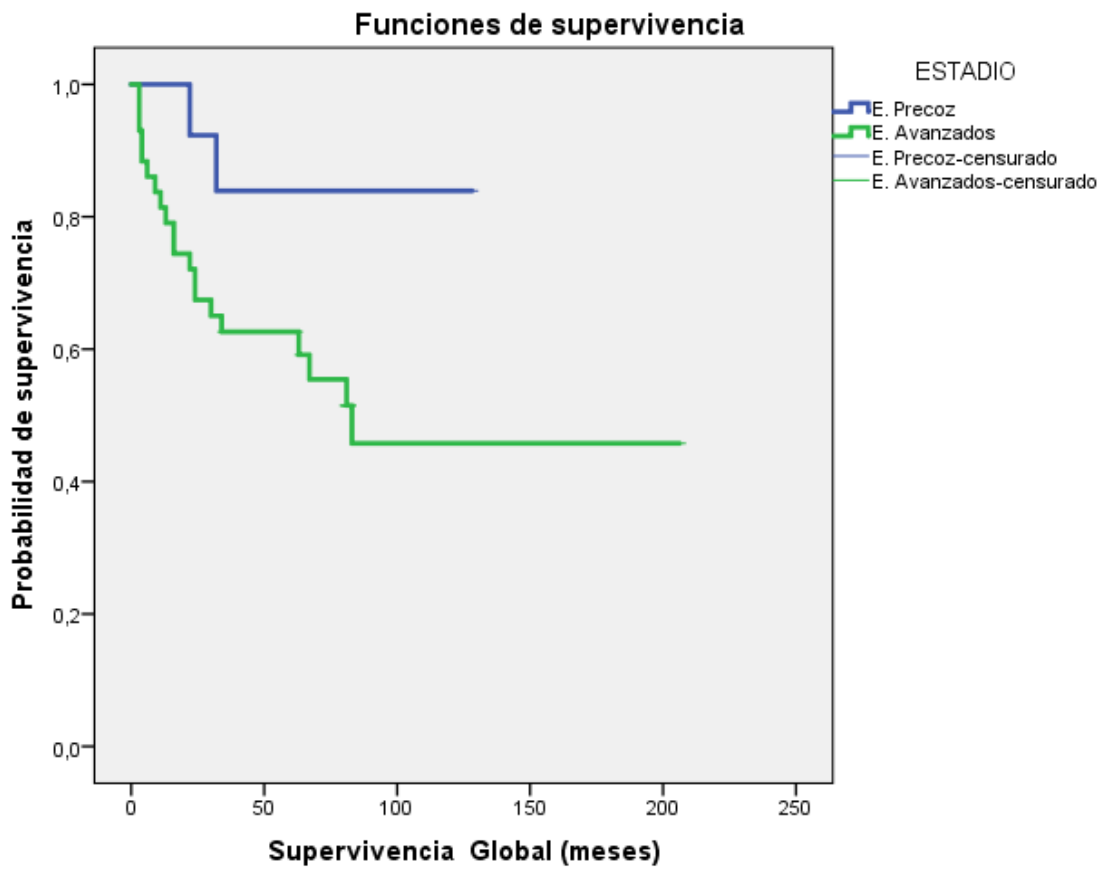


Figura 15: Supervivencia global/Invasión espacio retrofaríngeo

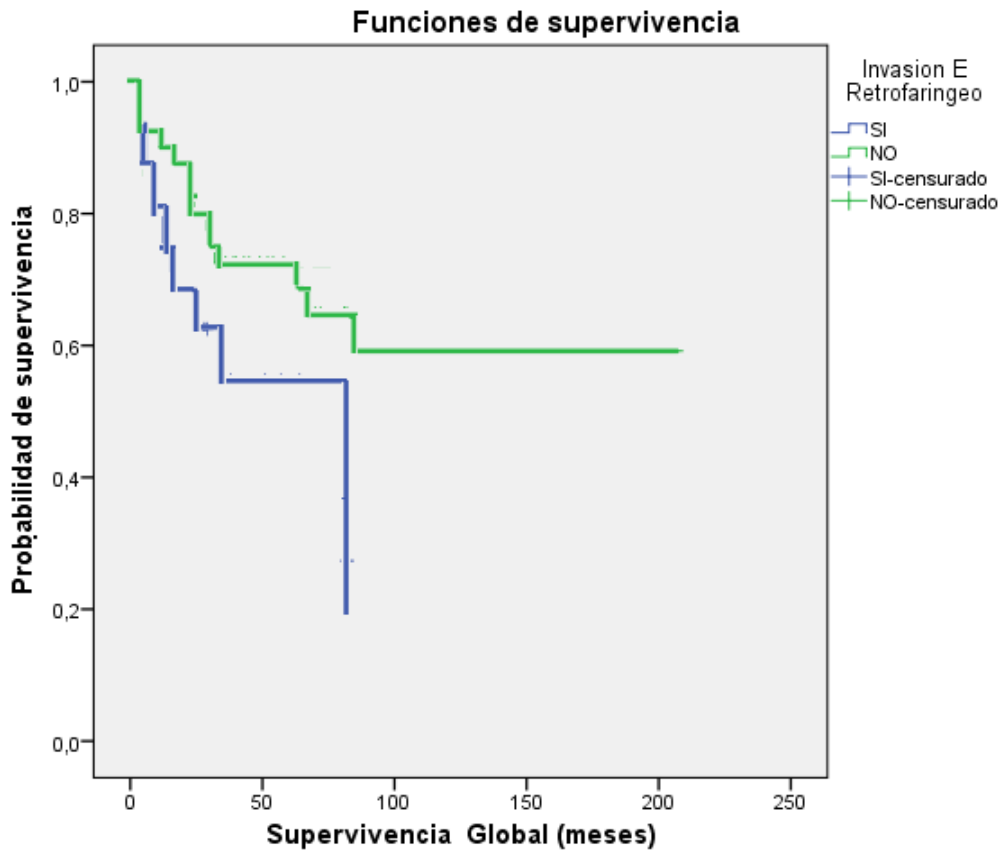


Figura 16: Supervivencia global/Afectación de pares craneales

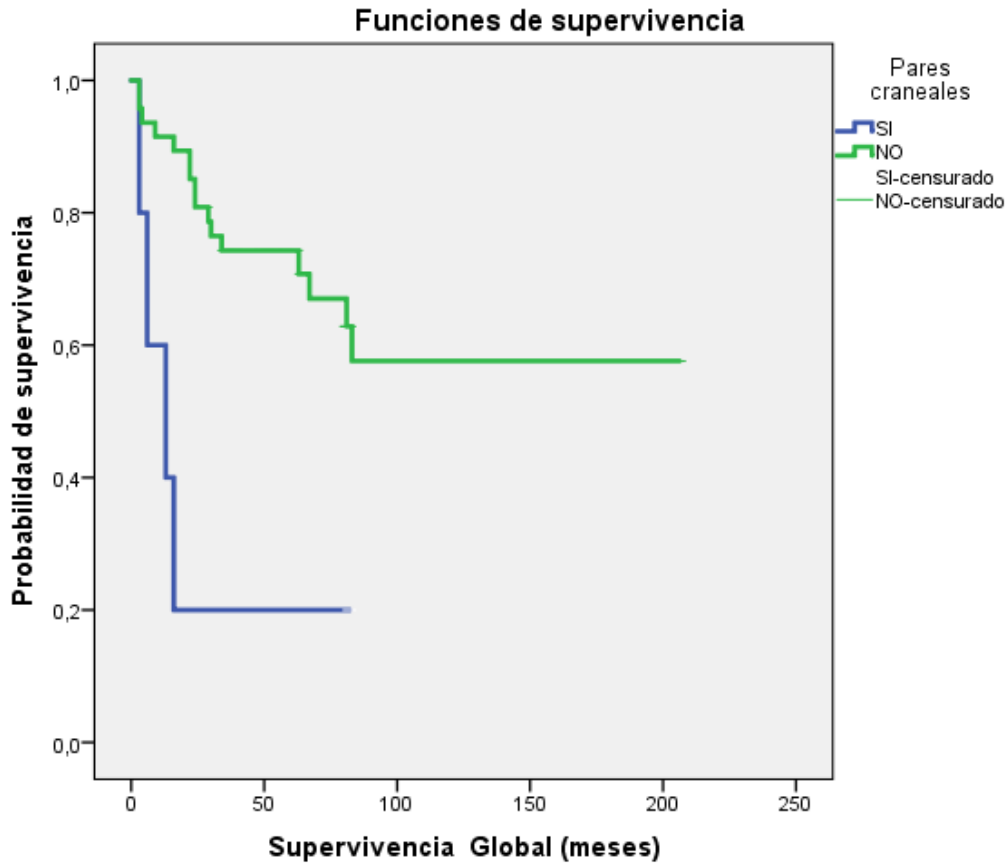


Figura 17: Supervivencia global/Erosión de la base del cráneo

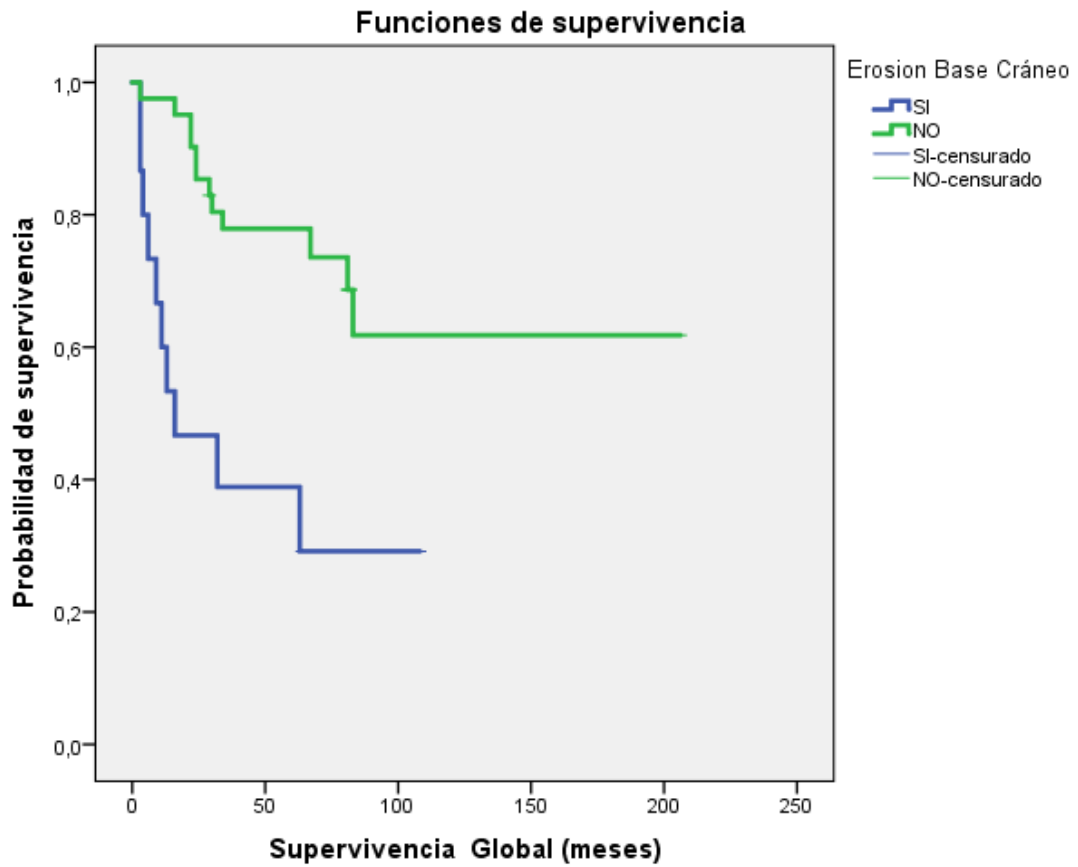
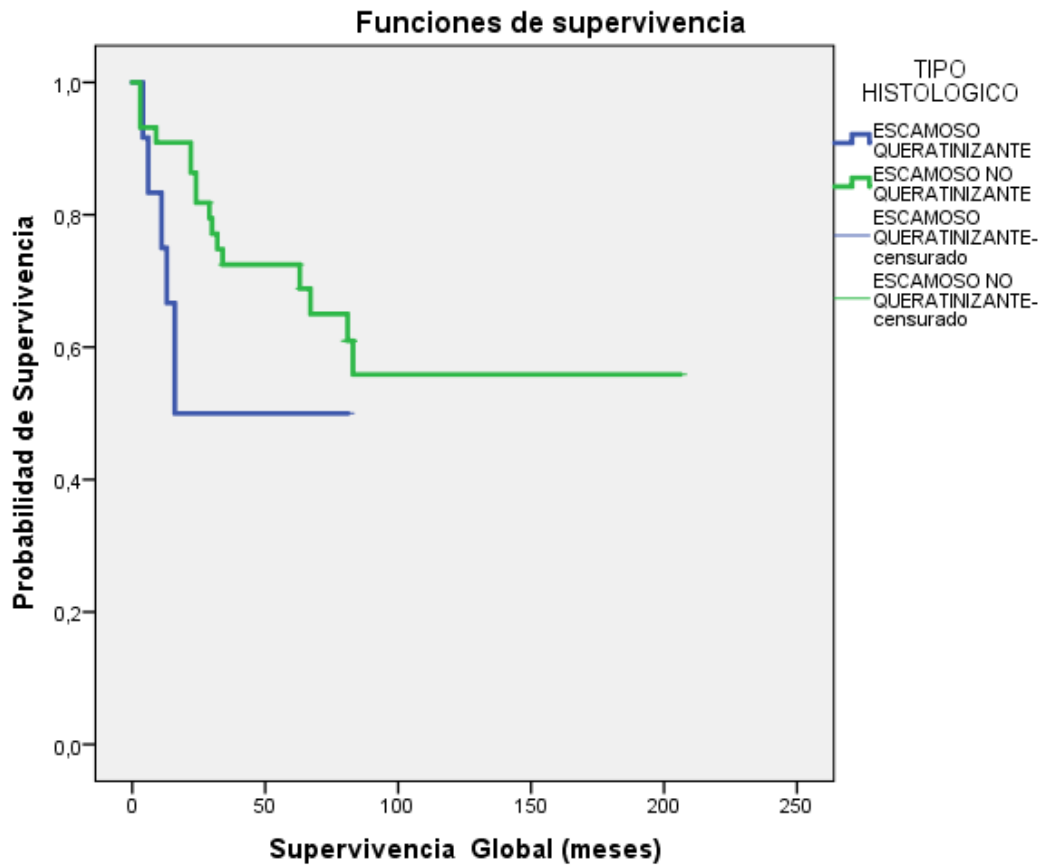




Figura 18: Supervivencia global/Tipo histológico





**7ª EDICIÓN DE LA CLASIFICACIÓN TNM AJCC** <sup>332</sup>Tabla 1: Categoría T

<b>Tx</b>	No se puede evaluar el tumor primario
<b>T0</b>	No hay prueba del tumor primario
<b>Tis</b>	Carcinoma In situ
<b>T1</b>	El tumor está confinado a la nasofaringe, o el tumor se extiende a la orofaringe o a la cavidad nasal o ambas, sin extensión parafaríngea
<b>T2</b>	Tumor con extensión parafaríngea
<b>T3</b>	Tumor que invade las estructuras óseas de la base del cráneo o los senos paranasales o ambos
<b>T4</b>	Tumor con extensión intracraneal o compromiso de los pares craneales o ambos, la hipofaringe, la órbita o con extensión a la fosa infratemporal o al espacio masticador

Tabla 2: Categoría N

<b>Nx</b>	No se puede evaluar los ganglios linfáticos en la regionales
<b>N0</b>	No hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales
<b>N1</b>	Metástasis unilateral en ganglio(s) linfático(s) cervical(es) $\leq 6$ cm en su mayor dimensión sobre la fosa supraclavicular, o de los ganglios linfáticos retrofaríngeos o de ambos, de manera unilateral o bilateral, $\leq 6$ cm en su mayor dimensión
<b>N2</b>	Metastasis bilateral en ganglio(s) linfático(s) cervical(es), $\leq 6$ cm en su mayor dimensión, sobre la fosa clavicular
<b>N3</b>	Metastasis en ganglio(s) linfático(s) $>6$ cm o en la fosa supraclavicular
<b>N3a</b>	$>6$ cm en dimensión
<b>N3b</b>	Extensión en fosa supraclavicular

Tabla 3: Categoría M

<b>M0</b>	No hay metástasis a distancia
<b>M1</b>	Presencia de metástasis a distancia

Tabla 4: Estadio

Estadio	T	N	M
<b>0</b>	Tis	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0
<b>II</b>	T1	N1	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0
<b>II</b>	T2	N1	M0
<b>III</b>	T1	N2	M0
<b>III</b>	T2	N2	M0
<b>III</b>	T3	N0	M0
<b>III</b>	T3	N1	M0
<b>III</b>	T3	N2	M0
<b>IVA</b>	T4	N0	M0
<b>IVA</b>	T4	N1	M0
<b>IVA</b>	T4	N2	M0
<b>IVB</b>	Cualquier T	N3	M0
<b>IVC</b>	Cualquier T	Cualquier N	M1